

Bibliothek der  
Technischen Hochschule  
Braunschweig

Ja  
294  
(Beih. N.F. 3/4)





UB Braunschweig

84



10086-601-8





Ja-294 (Beih. [N.F.] 3)

BEIHEFTE DER „PHARMAZIE“

HEFT 3

H. BRÄUNIGER

Grundlagen und allgemeine Fragen  
der Papierchromatographie

54.2302



VEB VERLAG VOLK UND GESUNDHEIT · BERLIN

1955

Auszugsweise als Vortrag auf dem „Kursus in Chromatographie“, Berlin-Weißensee,  
Institut für Lebensmittelchemie,  
unter dem Titel „Chromatographie von Alkaloiden“  
im Dezember 1953 gehalten.

1. bis 6. Tausend · Alle Rechte vorbehalten  
Copyright 1955 by VEB Verlag Volk und Gesundheit · Berlin  
Printed in Germany · Lizenz-Nr. 210 (445/101/55)  
Satz, Druck, Buchbinderei: (III/18/203) VEB Leipziger Druckhaus, Leipzig  
Gesetzt aus Borgis Baskerville



## VORWORT

Bei der Abfassung des vorliegenden Aufsatzes war nicht daran gedacht worden, diesen in Form einer Broschüre zu veröffentlichen, sondern es sollte lediglich ein kurzer Überblick über die Grundlagen der Papierchromatographie in einer Fachzeitschrift gegeben werden. Wenn daher einige interessante Fragen des behandelten Gebietes kürzer gefaßt wurden, als sie es vielleicht verdienen, so bitte ich deshalb, hierfür Verständnis zu haben. Möglicherweise ergibt sich hieraus für manchen Leser die Beschäftigung mit der Originalliteratur, eine begrüßenswerte Folgerung, die nicht nur zur Klärung von in diesem Aufsatz angeschnittenen Fragen führen, sondern gleichzeitig mit einer Reihe von Hinweisen bekannt machen würde, die für jeden auf dem Gebiet der Papierchromatographie praktisch Arbeitenden von Nutzen sein können.

Es sei mir an dieser Stelle erlaubt, der Universitätsbibliothek Rostock für die Mühe bei der Beschaffung der Originalliteratur meinen Dank auszusprechen.

*H. Bräuniger*





Während die Zahl der Veröffentlichungen, in denen die Anwendung der Papierchromatographie auf einzelne Gebiete, z. B. das der Aminosäuren, der Zucker usw., beschrieben wurde, schon sehr groß ist, kann dasselbe von den Arbeiten über die Grundlagen der Papierchromatographie nicht gesagt werden. Die hervorragenden Erfolge, die einzelne Arbeitsgebiete durch die Anwendung der Papierchromatographie zu verzeichnen hatten, lassen das zeitweilige Zurücktreten der Erforschung der Grundlagen der Papierchromatographie verständlich erscheinen. Daher sind im allgemeinen im deutschen (z. B. *Cramer* [19], *Lang* [43], *Decker* [21], *Rauen* [65], *Erbring* [25] usw.) sowie im ausländischen [7, 76, 16, 56, 6, 44, 28, 49, 83, 46, 78] Schrifttum — auch in Monographien — nur verhältnismäßig kurze Darlegungen über die Grundlagen der Papierchromatographie zu finden. Es erscheint jedoch lohnend, die Ausführungen näher zu betrachten, die in einer Anzahl von Veröffentlichungen besonders ausländischer Autoren als Folge ihrer experimentellen Befunde — oft sozusagen nur als, wenn auch wertvolles Nebenprodukt — erschienen sind und deren Studium ein einigermaßen klares Bild über die Vorgänge während der Chromatographie auf dem Filtrierpapier gibt. Weiterhin sei besonders die ausgezeichnete Arbeit von *Schute* [69] erwähnt, die sich dem Problem der Grundlagen der Papierchromatographie zuwandte und deren Ergebnisse im folgenden noch eingehend besprochen werden sollen. Der Zweck dieser Zeilen soll es sein, diese Arbeiten dem deutschen Leser näherzubringen, wodurch vielleicht manches Problem der Papierchromatographie in der Praxis leichter gelöst werden kann.<sup>1</sup>

Bekanntlich ist die Papierchromatographie aus der sogenannten Verteilungschromatographie an der Säule hervorgegangen. Von *Martin* und *Synge* [52], die ein Gemisch von azetylierten Aminosäuren trennen wollten, wurden an Stelle der bis dahin verwendeten Adsorptionssäulen, in denen eine feste Phase (die eigentliche Adsorptionssäule, z. B.  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MgO}$  usw.) und eine flüssige Phase (das Elutionsmittel) vorhanden waren, zwei flüssige Phasen verwendet, von denen sich die eine als wässrige Phase auf einer geeigneten Trägersubstanz befand. Als solche Träger-

<sup>1</sup> Während der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit erschien die Veröffentlichung von *Grüne* (30): „Papierchromatographie unter besonderer Berücksichtigung der Eigenschaften des Papiers“, auf die hiermit hingewiesen sei.

Weiterhin sei die Veröffentlichung von *L. Horner*, *W. Emrich* und *A. Kirschner*: „Experimenteller Beitrag zum Mechanismus der Papierchromatographie“ (*Z. Elektrochem.* **56**, 987—995 [1952]) erwähnt, die leider erst während der Korrektur der vorliegenden Arbeit hier bekannt wurde.

substanz verwendeten sie Silikagel, das eine gewisse Menge Wasser festhielt und so die sogenannte stationäre Phase bildete. Durch die feuchte Silikagelsäule ließen sie — in analoger Weise wie bei der Adsorptionschromatographie — eine Flüssigkeit laufen (die mobile Phase), die ein gewisses Lösungsvermögen für die Untersuchungssubstanz haben mußte. Dabei sollte nach ihrer Auffassung eine Verteilung der Untersuchungssubstanz zwischen der stationären und der mobilen Phase an der Säule vor sich gehen, die auf Grund des Verteilungskoeffizienten  $\alpha$  der Untersuchungssubstanz zwischen den beiden angewandten Flüssigkeiten geregelt werden sollte. Dieser Verteilungskoeffizient stellt das Verhältnis der Menge der gelösten Substanz in der stationären Phase zu der in der mobilen Phase vorhandenen bei eingetretenem Gleichgewicht zwischen den beiden Phasen und der Annahme dar, daß die Volumina der stationären und der mobilen Phase gleich sind (bei ungleichen Volumina spricht man von der Verteilungszahl [distribution number], die also vom Volumenverhältnis abhängig ist). Die Wanderungsgeschwindigkeit der Untersuchungssubstanz durch die Säule hing danach also u. a. von deren Löslichkeit in den beiden Phasen ab und mußte z. B. größer sein, wenn die Löslichkeit in der mobilen Phase größer war als die in der stationären Phase und umgekehrt. Diese Verhältnisse wurden von *Martin* und *Synge* [53] auch theoretisch untersucht, worauf die vorliegenden Ausführungen noch später zurückkommen werden.

Das Prinzip, Vorgänge der geschilderten Art als Verteilung einer Substanz zwischen zwei (oder mehr) Flüssigkeiten anzusehen, hat sich in der Folgezeit als sehr günstig für besonders schwierige Trennungen von Substanzen erwiesen. Die Tatsache, daß Silikagel sich als nicht ganz ideale, d. h. den Verteilungsvorgang nicht beeinflussende, inerte Substanz erwies — *Gordon, Martin* und *Synge* [29] stellten bei dem Versuch der Trennung von Aminosäuren störende Adsorptionserscheinungen an Silikagel fest —, führte zum Aufsuchen anderer Trägersubstanzen, z. B. von Kieselgur, Glaspulver, Zellulose usw. Die Verwendung der Zellulose als Trägersubstanz erfolgte in der Folgezeit entweder in pulverisierter Form — die Zellulose wurde in gepulverter Form in die Glassäule gefüllt und nach der Zugabe der Untersuchungssubstanz der geschilderte Verteilungsvorgang durchgeführt — oder in Form des Filtrierpapiers, wie es im chemischen Laboratorium schon immer verwendet wurde. Die Übertragung des Verteilungsgedankens gerade bei Verwendung von Filtrierpapier hat dann zur Papierchromatographie geführt, die im heutigen Laboratorium eine sehr wichtige analytische Nachweismethode ist. *Consden, Gordon* und *Martin* [18] beschrieben im Jahr 1944 zum ersten Mal die erfolgreiche Trennung einer sehr geringen Menge eines Aminosäuregemisches und konnten auch experimentell zeigen, daß die ursprünglich für die Verhältnisse an der Säule entwickelte Verteilungstheorie auch für die Vorgänge an der Oberfläche der Zellulose gelten kann. Von besonderer Wichtigkeit war hierbei, daß die vorausgerechneten und die experimentell gewonnenen Werte unter Annahme gewisser Versuchsverhältnisse übereinstimmten und daß die Wahrscheinlichkeit, daß bei der Papierchromatographie Verteilungsvorgänge eine maßgebende Rolle spielen, sehr groß wurde.



Bevor jedoch die näheren Verhältnisse des papierchromatographischen Vorganges besprochen werden, soll zunächst noch kurz auf die mathematische Behandlung des Verteilungsvorganges eingegangen werden, wie sie von *Martin* und *Synge* [53] entwickelt und von *Consden*, *Gordon* und *Martin* [18] später auf die Papierchromatographie übertragen wurde. Man kann sich vorteilhafterweise die feuchte Säule, durch die die Elutionsflüssigkeit rinnt, aus einer großen Anzahl von Mikroscheidetrichtern aufgebaut denken, in denen die stufenweise Ausschüttlung, d. h. Verteilung der Untersuchungssubstanz, vor sich geht. Die Heranziehung des Vergleiches mit einer fraktionierten Destillation unter Verwendung eines Kolonnen-aufsatzes — bei der bekanntlich die Zusammensetzung der gasförmigen Phase immer in einem bekannten Verhältnis zu der der flüssigen steht — hatte den Vorteil, daß sich die mathematische Entwicklung der Verteilungschromatographie an bereits bekannte, mathematisch formulierte Verhältnisse anlehnen konnte. *Martin* und *Synge* [53] führten den Begriff des theoretischen Bodens (Platte) in die Verteilungschromatographie ein, indem sie sich die Säule in eine Anzahl von sehr kleinen Abschnitten zerlegt dachten, von denen jeder einem theoretischen Boden entsprechen sollte. Die Höhe dieses theoretischen Bodens (als H.E.T.P. = height equivalent to one theoretical plate bezeichnet) wurde durch die Schichtdicke festgelegt, bei der sich die mobile Phase beim Übertritt in den nächsten theoretischen Boden im Gleichgewicht mit der mittleren Konzentration der gelösten Substanz in der stationären Phase befindet, m. a. W. bei der also ein quantitativer Verteilungsvorgang der gelösten Substanz zwischen den beiden Phasen des eventuell zu denkenden Mikroscheidetrichters bereits stattgefunden hat. Wenn  $C_S$  die mittlere Konzentration in der stationären Phase und  $\alpha$  der Verteilungskoeffizient der gelösten Substanz zwischen den beiden angewendeten Flüssigkeiten (meist Wasser einerseits, organische Flüssigkeit andererseits) ist, dann muß nach dem Nernstschen Verteilungsgesetz in einem Segment, wie es eben besprochen wurde, die Beziehung gelten:

$$C_S = \alpha \cdot C_L$$

( $C_L$  = Konzentration der gelösten Substanz in der mobilen Phase, wenn diese in den nächsten theoretischen Boden übertreten will).

Die Höhe eines solchen theoretischen Bodens ist theoretisch nicht konstant, sondern abhängig von der Durchlaufgeschwindigkeit der mobilen Phase durch die Säule, der Diffusionsgeschwindigkeit der gelösten Substanz in den beiden Flüssigkeiten und der Teilchengröße des Trägers. Jedoch kann sie, da sich die angeführten Größen während eines Versuches im allgemeinen wenig ändern werden, in der Praxis als konstant angesehen werden. Es ist verständlich, daß eine Säule um so leistungsfähiger im Hinblick auf die Trennung eines Substanzgemisches sein wird, je mehr sie an solchen theoretischen Böden (= Mikroscheidetrichter) enthält, d. h. je kleiner diese sind. *Martin* und *Synge* geben 0,002 cm als Schichthöhe der eben besprochenen Eigenschaft bei ihren Säulenversuchen an und weisen dabei auf die erheblich höhere Leistungsfähigkeit einer solchen Säule gegenüber der der besten Destillations- und Extraktionskolonnen (1 cm) hin.

Da bei der geschilderten Betrachtungsweise die Art des Trägers keine Rolle spielt, müssen die gleichen Ansätze auch bei der Verwendung von Zellulose als Trägersubstanz Gültigkeit haben. *Consden, Gordon und Martin* [18] verwendeten dafür einen den Verhältnissen an der Säule analogen mathematischen Ansatz und klärten besonders die Beziehung des Verteilungskoeffizienten zur Wandergeschwindigkeit der gelösten Substanz. Bei Heranziehung folgender Größen:

$A_L$  = Querschnittsfläche der Elutionsphase

$A_S$  = Querschnittsfläche der wäßrigen Phase

$$\alpha = \text{Verteilungskoeffizient} = \frac{\text{Konzentration in H}_2\text{O-Phase}}{\text{Konzentration in Elutionsphase}}$$

stellten sie folgende Beziehung auf:

$$R_f = \frac{A_L}{(A_L + \alpha \cdot A_S)}$$

In dieser Formel trat zum ersten Mal der  $R_f$ -Wert-Begriff (Retentions-Faktor) auf, der das Verhältnis der Laufstrecke der gelösten Substanz zu der des Elutionsmittels darstellte. Dieser  $R_f$ -Wert ist also von dem Verteilungskoeffizienten der gelösten Substanz einerseits und von der Größe der mobilen bzw. stationären Phase in einem theoretischen Boden andererseits abhängig, was wiederum beim Vergleich mit dem Verteilen einer Substanz zwischen 2 Phasen in einem Scheidetrichter verständlich wird. Er wird um so größer sein, je kleiner der  $\alpha$ -Wert für die gelöste Substanz ist und umgekehrt. Die angegebene Formel hat *Schute* [69, 70, 71] noch in verschiedener Weise umgeformt, z. B.

$$R_f = \frac{1}{\left(1 + \alpha \frac{A_S}{A_L}\right)}$$

was für manche Überlegungen Vorteil\* bringen kann. Aus dieser und auch der zuerst aufgeführten Formel ist zu ersehen, daß der  $R_f$ -Wert von der Menge des im Chromatogramm aufgesetzten Stoffes sowie von anderen Stoffen unabhängig sein muß, da sie nicht in der Formel auftreten. Wenn in der Praxis dennoch zuweilen eine solche Abhängigkeit beobachtet worden ist, so lagen dann meistens besondere Verhältnisse vor, die eine einwandfreie Verteilung nicht zuließen.

Die angeführte Formel weist weiter darauf hin, daß die Form des auf das Papier aufgesetzten Substanzfleckes bei Voraussetzung einer ordnungsgemäßen Verteilung immer die gleiche sein muß, ein aufgesetzter runder Fleck auch wieder einen solchen nach der Wanderung ergeben muß, worauf *Schute* [69, 75] öfter hinweist. Im anderen Fall müssen noch weitere Faktoren, z. B. Adsorption, die Wanderung der gelösten Substanz beeinflussen haben, worüber später noch eingehend gesprochen wird.

Mit der zuerst angegebenen Formel läßt sich also der  $R_f$ -Wert einer Substanz berechnen, wenn die Werte für  $\alpha$ ,  $A_L$  und  $A_S$  bekannt sind. Durch Umformung läßt sich aber auch eine Formel gewinnen, die umgekehrt den Verteilungskoeffizienten  $\alpha$  aus den Größen  $R_f$ ,  $A_L$  und  $A_S$  errechnen läßt und wie folgt lautet:

$$\alpha = \frac{A_L}{R_f \cdot A_S} - \frac{A_L}{A_S} = \frac{A_L}{A_S} \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right).$$

In den angegebenen Formeln treten nur experimentell meßbare Größen auf. Der  $R_f$ -Wert kann, wie allgemein bekannt, auf dem Chromatogramm direkt gemessen werden; die Feststellung des Verteilungskoeffizienten  $\alpha$  bietet im allgemeinen auch keine Schwierigkeiten. Nur für Sonderfälle, über die noch berichtet wird, ist seine Berechnung aus einem Chromatogramm durchgeführt worden. Nicht ganz so einfach ist die Bestimmung von  $A_S$  und  $A_L$ , die in der Praxis gravimetrisch geschieht und nach Umrechnung mit Hilfe der Dichte der Flüssigkeit der stationären bzw. der Elutionsphase volumetrisch angegeben werden kann, weshalb *Schute* [69] an Stelle der Bezeichnungen  $A_S$  und  $A_L$  bei der Feststellung dieser Größen die Bezeichnungen  $V_S$  und  $V_L$  (= Volumenphasen) setzt. *Consden*, *Gordon* und *Martin* [18] bildeten bei Annahme eines gegebenen konstanten Wassergehaltes im verwendeten Papier (der die stationäre Phase bildete) einfach den Quotienten aus dem Gewicht des noch nicht chromatographierten, trockenen Papiers und aus dem Gewicht des Papiers nach der Durchführung der Chromatographie, das also noch die mobile Phase enthielt, und setzten dieses dem Wert von  $\frac{A_S}{A_L}$  gleich. Dabei waren sie sich aber bewußt, daß der Wassergehalt des Papiers in der Praxis verschieden sein kann, so daß ihre errechneten Werte keine sicheren Ergebnisse sein konnten.

Nicht ganz so einfach ist die Art und Weise, wie *Schute* [69] zu diesen Werten kommt. Er bemerkt zunächst, daß das Verhältnis  $\frac{A_S}{A_L}$  gleich dem Verhältnis der Volumina ist, die die stationäre und die mobile Phase in einer bestimmten Menge Papier einnehmen  $\left( = \frac{V_S}{V_L} \right)$ . Der Wert für  $V_L$  läßt sich berechnen, wenn man das Kapillarovolumen des lufttrockenen Papiers mißt, das ja nach dem Chromatographieren mit der Elutionsphase gefüllt ist. Zu diesem Zweck läßt *Schute* in einem vorher gewogenen Papierstreifen ( $5 \times 30$  cm, mit 7,2% Wassergehalt) Petroleum in der gleichen Art aufsteigen, wie es auch sonst bei der aufsteigenden Methode durchgeführt wird, schneidet das vollgesogene Papier dann in Abschnitte der Größe  $5 \times 5$  cm und wägt diese mit Ausnahme des obersten und des untersten Abschnittes einzeln. Die daraus berechnete Petroleummengende zeigt, daß diese in dem verwendeten Papierstreifen von oben nach unten zunimmt, in der Frontzone (bei aufsteigender Methode!) also viel geringer ist als direkt über der Oberfläche



des Elutionsmittels, was für die Papierchromatographie großes allgemeines Interesse hat. (Beispiel: %-Gehalt an Petroleum gegenüber dem Gewicht des lufttrockenen Papiers:

2. Abschnitt . . . . .	32,6%
3. Abschnitt . . . . .	58 %
4. Abschnitt . . . . .	64,5%
5. Abschnitt . . . . .	72 %.)

Daher ist es eigentlich gar nicht möglich, einen einheitlichen  $V_L$ - und  $A_L$ -Wert anzugeben. (Sich ändernde Mengen der einen Phase beim Vergleich mit dem Arbeiten im Scheidetrichter!) *Schute* tut dieses dennoch, da sich die Werte des 3., 4. und 5. Abschnittes etwas nähern (58—72% in der oben angeführten Versuchsreihe), um so ein annäherndes Bild der Größe von  $V_L$  zu erhalten (Durchschnitt: 65% des Papiergewichtes an Petroleum ( $s = 0,8$ ), das etwa 81% des Papiergewichtes, als Wassergewicht angegeben ( $s = 1,0$ ), entsprechen würde, wodurch gleichzeitig das durch die Elutionsflüssigkeit gefüllte Volumen des Papierstreifens errechnet ist).<sup>1</sup>

Zur Bestimmung der Größe von  $A_s$  bzw.  $V_s$ , also der anderen Komponenten des Quotienten  $\frac{A_s}{A_L}$  bzw.  $\frac{V_s}{V_L}$  läßt *Schute* auf eine gewogene Menge lufttrockenen Filtrierpapiers längere Zeit Wasserdampf einwirken und bestimmt in gewissen Zeitabständen die Gewichtszunahme des Papiers, die nicht linear, sondern zunächst stärker, dann langsamer verläuft. Nach 40stündiger Einwirkung tritt kaum noch eine Änderung ein, so daß damit der Maximalwert erreicht ist. Unter der Annahme, daß das dabei aufgenommene Wasser das gleiche spezifische Gewicht wie gewöhnliches Wasser hat, kann daraus der Wert für  $V_s$  bzw.  $A_s$  berechnet werden. Für den maximalen Wert von  $V_s (= A_s)$  ergab sich bei den Versuchen von *Schute* 28% des Gewichtes des lufttrockenen Papiers, jedoch kann dieser Wert nicht als immer zutreffend gelten, da nicht immer das Papier an Wasserdampf maximal gesättigt ist und außerdem dieser Sättigungswert je nach Papiersorte variieren wird. Daher wird auch für den Quotienten  $\frac{V_s}{V_L}$  bzw.  $\frac{A_s}{A_L}$  kein einheitlicher Wert anzugeben sein. *Schute* fand in seinen Versuchen (Butanol als Elutionsmittel)

- a) für behandeltes Papier, auf das 70 Minuten lang Wasserdampf eingewirkt hatte:

$$\frac{A_s}{A_L} = 0,62 \text{ bis } 0,44,$$

<sup>1</sup> Vergleiche die ähnlichen Ergebnisse von L. Horner, W. Emrich und A. Kirschner (Z. Elektrochem. **56**, 987 bis 995 [1952]) unter Verwendung von Phenol-Wasser. Diese Autoren fanden außerdem noch eine Anreicherung des Phenols in den oberen Zonen des aufsteigenden Lösungsmittelgemisches und bringen mit dieser Tatsache „z. B. die hohen  $R_f$ -Werte hydrophober Substanzen gegenüber hydrophileren chromatographierten Stoffen“ in Zusammenhang.

b) für Papier, auf das 40 Stunden lang Wasserdampf eingewirkt hatte:

$$\frac{A_S}{A_L} = 0,62 \text{ bis } 0,44,$$

jedoch haben auch diese Angaben keinen allgemein gültigen Wert. Weitere sehr interessante Einzelheiten hierzu müssen im Original [69] nachgelesen werden, wo *Schute* auch die Übereinstimmung der berechneten mit den experimentell bestimmten Werten zeigen konnte.

Auf Grund der obigen Ausführungen können also alle Komponenten der Gleichung, wie sie von *Consden*, *Gordon* und *Martin* aufgestellt wurde (18), experimentell bestimmt werden, wobei es für die genannten Autoren günstig war, daß die Verteilungskoeffizienten einer Reihe von Aminosäuren zwischen Wasser und z. B. zwischen *n*-Butanol früher bereits bestimmt worden waren (*England* und *Cohn* [24]), so daß diese nur in die angegebene Formel eingesetzt zu werden brauchten. Diese Autoren verglichen die berechneten und die experimentell bestimmten  $R_f$ -Werte und fanden bei Annahme eines Wassergehaltes von etwa 20% im Papier für *n*-Butanol als mobile Phase gute Übereinstimmung.

Die Übereinstimmung der berechneten und der experimentell bestimmten  $R_f$ -Werte legte, wie bereits erwähnt, die Vorstellung nahe, daß auch bei der Papierchromatographie die Verteilung eine maßgebende Rolle spielt. Die Annahme einer Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen hat zudem den Vorteil, worauf *Moore* und *Stein* [56] hinweisen, daß zwei besondere Eigenschaften der Flüssigkeit beachtet werden: 1. die Fähigkeit der gelösten Substanz, in das Innere von Flüssigkeitströpfchen zu diffundieren, 2. die Abwesenheit von streng orientierten (z. B. festen) Oberflächen in flüssigem Material, wodurch sich ein System ergeben kann, das frei von Adsorptionsunsicherheiten an einer festen Oberfläche ist. Hier liegt also der Unterschied zwischen einem Flüssig-Flüssig- und einem Flüssig-Fest-Chromatogramm.

Dennoch blieben die erwähnten Vorstellungen über die Vorgänge in der Papierchromatographie nicht immer unwidersprochen. So erhob *Craig* [20] Bedenken gegen die Auffassung des Verteilungsvorganges als die eines diskontinuierlichen Prozesses, wie es von *Martin* und *Synge* durch die angenommene Unterteilung der Säule in kleinste Einheiten (theoretische Böden, H. E. T. P.) geschehen war, und ging von der Vorstellung aus, es könne bei dem in Wirklichkeit vorliegenden kontinuierlichen Prozeß nur von einer Gleichgewichtsannäherung gesprochen werden. Er prüfte die Verhältnisse bei der Gegenstromverteilung unter Bedingungen, bei denen es nicht zur Einstellung des Gleichgewichtes kam und der  $\alpha$ -Wert daher keine Gültigkeit hatte, mit Hilfe seiner Gegenstromverteilungsapparatur und fand, daß der gefundene Ort der maximalen Konzentration der gleiche wie bei völligem Gleichgewicht sein kann. Praktisch würde dieses bedeuten, daß in der Chromatographie auch dann z. B. eine Trennung von Substanzen eintreten kann, wenn eine exakte Verteilung der gelösten Substanz unter Zugrundelegung des Verteilungskoeffizienten  $\alpha$  gar nicht stattgefunden hat. Tatsächlich ist es auch

nicht ganz einfach einzusehen, daß innerhalb der kurzen Berührungszeit, die zwischen der mobilen und stationären Phase an irgendeinem Ort der Säule besteht, eine vollständige, mathematisch festgelegte Verteilung der gelösten Substanz vor sich gehen soll. Auf die Entgegnung auf diese Auffassung durch *Schute* [69, 73] sei aber verwiesen, der in den *Craigschen* Versuchen keinen Beweis gegen das Vorliegen der Flüssig-Flüssig-Verteilung sieht.

Aber auch durch einige weitere experimentelle Ergebnisse wurde die Vorstellung von der Verteilung der Substanz in Zweifel gezogen, unter denen besonders zwei Punkte zu nennen sind. Zunächst konnte — bereits von *Consden*, *Gordon* und *Martin* [18] — beobachtet werden, daß auch mit wassermischbaren organischen Lösungsmitteln papierchromatographische Trennungen durchgeführt werden konnten. Diese Tatsache schien dem Verteilungsprinzip zu widersprechen, das zwei miteinander nicht mischbare Phasen erforderte. Auf die Diskussion dieser Frage soll später noch eingegangen werden. Außerdem wurden zuweilen bei papierchromatographischen Arbeiten zweifellos Adsorptionserscheinungen beobachtet, weshalb die Möglichkeit diskutiert wurde, den gesamten papierchromatographischen Vorgang durch das Auftreten von Adsorptionsvorgängen zu erklären. Dieses versuchten *Decker* und *Riffart* [22], die auf Grund ihrer guten Erfahrungen bei der Verwendung von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln für papierchromatographische Zwecke die Verteilungstheorie ablehnten und die papierchromatographischen Vorgänge auf Adsorptionserscheinungen im Sinne von *Langmuir* zurückführten. Dabei ergab sich aber die Schwierigkeit, daß „an den Stellen, an denen die Oberfläche mit der Substanz gesättigt ist, d. h. in der Mitte der Flecken und in Flecken, die eine größere Substanzmenge enthalten, ein größerer Anteil der Substanz in Lösung bleibt. Dies hätte zur Folge, daß dort eine größere Wanderungsgeschwindigkeit eintreten muß, d. h. höhere  $R_f$ -Werte auftreten sollten. Dies ist nun unzweifelhaft nicht der Fall.“ Zur Erklärung der Tatsache, daß konstante  $R_f$ -Werte erhalten werden, was eigentlich gegen die Adsorption und für die Verteilungstheorie spricht, weisen die Verfasser auf die relativ schnelle Ausbreitung der Flecke auf dem Papier hin, „bis sie eine Fläche einnehmen, die in gewissen Bereichen der Substanzmenge annähernd proportional ist. Wir nehmen an, daß durch diese Ausbreitung die Konzentration so weit erniedrigt wird, daß die Oberfläche nur noch teilweise besetzt ist und die Adsorption in einem Bereich der *Langmuirschen* Isotherme stattfindet, in welchem Proportionalität zwischen der Konzentration und der adsorptiven Stoffmenge besteht.“

Die weiteren Ausführungen sind der Rolle eines Wasserzusatzes zum Elutionsmittel gewidmet und sollen hier zunächst übergangen werden.

Auch *Burma* und *Banerje* [15] hatten sich für das teilweise Vorliegen einer Adsorption auf Grund ihrer papierchromatographischen Arbeiten mit Aminosäuren und Zuckern unter Verwendung von Wasser als Elutionsmittel entschieden. Sie fanden, daß dabei die  $R_f$ -Werte der untersuchten Substanzen nahe, aber nicht gleich 1 seien und hatten daher auf eine geringe Adsorption der chromatographischen Substanzen an die Zellulose geschlossen.



Auf eine Mitwirkung, wenn auch nicht auf das ausschließliche Vorliegen von Adsorptionsvorgängen, schlossen auch *Moore* und *Stein* [57], als sie im Verlauf ihrer Trennungsversuche von Aminosäuren bei einigen von diesen (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin) sowohl auf dem Papier wie auch an Stärke Abweichungen von den aus den bekannten Verteilungskoeffizienten errechneten  $R_f$ -Werten fanden.

Schließlich seien noch die Ausführungen von *Erbring* [25] besprochen, die er in einer Arbeit über die chromatographische Trennung der Inhaltsstoffe von *Hydrastis canadensis* machte. Angesichts der Tatsache, daß auch mit Wasser mischbare Elutionsmittel mit Erfolg zu papierchromatographischen Arbeiten verwendet werden können, glaubt er, daß eine theoretische Behandlung nur vom Standpunkt der Verteilungstheorie allein nicht möglich ist, wenn nicht „Sekundärentmischungen“ innerhalb der homogenen Flüssigkeitsphase, z. B. in einem Gemisch Äthanol-Wasser, angenommen werden. Der Verfasser glaubt vielmehr, daß man „zwischen zwei ineinandergreifenden verschiedenartigen Gleichgewichtseinstellungen unterscheiden muß: dem Adsorptionsgleichgewicht zwischen der an der Zellulosefaser adsorbierten und in der sogenannten stationären Phase gelösten Substanzmenge und dem Verteilungsgleichgewicht des betreffenden Stoffes zwischen stationärer und beweglicher Phase. Da nun die bewegliche Phase (organische Komponente) laufend vom Ort der Gleichgewichtseinstellung abwandert, wird sich das Gleichgewicht ständig neu einstellen. Es bedeutet dieses, daß der Stoff unter Durchlaufen ständig neuer Gleichgewichte: Adsorption : Zellulosefaser/Lösung — sowie Verteilung : stationäre/bewegliche Phase allmählich in Richtung der Flüssigkeitswanderung sich fortbewegt. Die isotherme Wanderungsgeschwindigkeit wird somit durch 3 Faktoren bestimmt, nämlich durch den Adsorptionskoeffizienten, durch den Verteilungskoeffizienten und durch die Sauggeschwindigkeit der verwandten Papiersorte.“ Der Verfasser glaubt, daß je nach dem betrachteten System der eine oder der andere Mechanismus bedeutsam wird und daß die Adsorption bei der Elution mit wassermischbaren Elutionsmitteln überwiegen dürfte (s. dazu jedoch die Ergebnisse von *Schute* [69]). Außerdem dürfe man die elektrochemischen Vorgänge an der negativ aufgeladenen Grenzfläche der Papier- bzw. Zellulosefaser und dem kapillar sich fortbewegenden gelösten Stoff nicht außer acht lassen. Für die Ansicht, daß je nach Wahl des Elutionsmittels Verteilungs- oder Adsorptionsgleichgewichte vorherrschen werden, führt der Verfasser auch einige interessante experimentelle Versuche an, indem er die Fluoreszenzintensitäten von reinem Berberin- bzw. Hydrastininsalz in verschiedenen Lösungsmitteln mit und ohne Berührung mit dem Filtrierpapier feststellte. Es zeigte sich eine Differenz der Intensitäten, die bei wassergesättigtem Collidin sehr gering, bei Äthanol-Wasser erheblich höher war. Der Verfasser erklärte diese Befunde durch die Annahme, daß beim Arbeiten mit Wasser gesättigtem Collidin nur wenig Adsorption stattfindet, der Verteilungsvorgang also vorherrscht, während die Verhältnisse im Äthanol-Wasser-System umgekehrt liegen. Für die Schwanzbildung käme außerdem noch die Dissoziationskonstante der untersuchten Substanz zusätzlich als maßgeblicher Faktor in Frage, worüber später noch eingehend berichtet wird.

\*

Die bisher geschilderten Veröffentlichungen gingen alle von einer für die Praxis notwendigen Trennungsmöglichkeit bestimmter Stoffe aus und zogen aus den Beobachtungen während ihrer Versuche Schlüsse hinsichtlich der grundsätzlichen Dinge der Papierchromatographie. Jedoch waren bis vor kurzer Zeit noch keine Arbeiten bekannt, die sich nur mit dem Studium des Mechanismus der Vorgänge in der Papierchromatographie befaßten, also nicht nur die Anwendung zu einem besonderen Zweck verfolgten. Erst die Arbeiten von *Schute* haben mehr Licht in dieses Gebiet gebracht, der sich sehr eingehend mit den Vorgängen während der Papierchromatographie beschäftigte [69, 70, 71, 72, 74, 75] und eine Reihe sehr interessanter Versuche zur Klärung dieser Frage angestellt hat. Da seine Befunde als sehr wichtig für das Verständnis anzusehen sind, soll besonders seine zusammenfassende Arbeit hier ziemlich eingehend wiedergegeben werden. Sie brachte auch Klärung in der Frage, ob und wann von Verteilungs- oder Adsorptionerscheinungen bei papierchromatographischen Vorgängen zu sprechen ist. Zum Verständnis der Versuche *Schutes*, aber auch der Papierchromatographie überhaupt, ist jedoch eine kurze Betrachtung des Trägers der Vorgänge, nämlich der Zellulose, notwendig, die sich nach *Schutes* [69] und *Martins* [50] Vorbild auf die sehr guten Ausführungen von *Hermans* [33] stützen soll (siehe außerdem die Darstellung von *Frey-Wyssling* und *Mühlethaler* [27a]). Es sei darauf hingewiesen, daß auch *Cassidy* [16] eine sehr eingehende Darstellung des Aufbaues von Baumwolle und Filtrierpapier im Rahmen einer größeren Betrachtung gegeben hat und daß in jüngster Zeit *A. Grüne* [30] über die „Papierchromatographie unter besonderer Berücksichtigung der Eigenschaften des Papiers“ berichtet hat. Eine experimentelle Arbeit von *Kowkabany* und *Cassidy* [41] prüfte die Eignung von 22 Filtrierpapiersorten, den Einfluß mehrerer Faktoren auf die Fließgeschwindigkeit des Elutionsmittels sowie auf die Größe der  $R_f$ -Werte [42], worauf hier nur hingewiesen sei.

Bekanntlich ist Zellulose aus Glukosemolekelen aufgebaut, die in 1,4- $\beta$ -glykosidischer Bindung miteinander zu langen Ketten verbunden sind. Bei der Aufarbeitung aus Holz kann die Länge der Ketten durch Hydrolyse verkürzt werden, wobei die Aldehydgruppe am  $C_1$ -Atom der Glukose in Freiheit gesetzt wird, so daß die Zellulose ein gegen Kupfer(2)sulfatlösung feststellbares Reduktionsvermögen erhält. Gutes Filtrierpapier hat eine sogenannte Kupferzahl von 0,4 oder weniger [79]. Es ist weiterhin möglich, daß durch den Luftsauerstoff, besonders in alkalischem Milieu, oder durch andere Oxydationsmittel (z. B. NaOCl bei der Aufarbeitung des Zellstoffes) einige Hydroxylgruppen der Glukosemoleküle der Zellulose zu Karboxylgruppen oxydiert werden, wodurch die sogenannte Oxyzellulose entsteht. Der Säuregrad eines guten Papiers wird in der Größenordnung von  $p_H = 6$  angegeben [80].

*Husemann* und *Weber* [35] sowie *Schönfeld* und *Reinharz* [67] geben an, daß die Bildung der Karboxylgruppen hauptsächlich auf die Oxydation der primären Hydroxylgruppen in 6-Stellung der Glukosereste zurückzuführen und daß auf 90–130 Glukosereste etwa 1 Karboxylgruppe anzunehmen sei. Dieses quantitative Verhältnis (1 : 125) konnte von *Broda* und *Schönfeld* [12] auf ganz anderem Wege

bestätigt werden. Das Vorhandensein derartiger Karboxylgruppen spielt sowohl bei den Erklärungsversuchen von *Martin* [50] wie auch von *Schute* [69] eine bedeutende Rolle.

In der Praxis ist es üblich,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - (= Hemi-)Zellulose auf Grund ihres verschiedenen Löslichkeitsverhaltens in Natronlauge (17,5%) zu unterscheiden. In diesem Reagens ist  $\alpha$ -Zellulose unlöslich, während sich  $\beta$ - und  $\gamma$ -Form darin löst. Jedoch läßt sich die  $\beta$ -Form mit Säuren aus dieser Lösung wieder ausfällen, während die  $\gamma$ -Form auch dann in Lösung bleibt. Die einzelnen genannten Formen unterscheiden sich durch den Polymerisationsgrad, wobei die  $\alpha$ -Form den höchsten, die  $\gamma$ -Form den niedrigsten hat und zusammen mit der  $\beta$ -Form die Hemizellulose bildet. Daneben enthält die Zellulose noch in geringer Menge anorganische Salze, die, wie von *Schute* [69] gezeigt wurde, für die papierchromatographischen Vorgänge ebenfalls von Wichtigkeit sein können.

Trotz der sich hinsichtlich der Lösungsfähigkeit verschieden verhaltenden Bestandteile der Zellulose zeigt diese im Röntgendiagramm einen kristallinen Aufbau, was sowohl von trockener wie von feuchter Zellulose gilt (eine Änderung in der Reflektion des kristallinen Teiles, der etwa 60% der gesamten Zellulose ausmacht, durch Befeuchten tritt nicht ein). Die Zelluloseketten verlaufen parallel nebeneinander und sind wegen des zahlreichen Vorkommens der Hydroxylgruppen der Glukosemolekel und der dadurch ermöglichten vielen Wasserstoffbrückenbindungen sehr stark miteinander verbunden, so daß eine starke mechanische Festigkeit entsteht, wie sie von der Zellulose bekannt ist. Diese Inanspruchnahme der Hydroxylgruppen durch Wasserstoffbrückenbindungen bewirkt übrigens auch, daß Zellulose in Wasser unlöslich ist, eine Tatsache, die eigentlich bei dem Vorhandensein einer so großen Anzahl von Hydroxylgruppen in der Zellulose unverstänlich bleiben müßte, worauf *Schute* [69] besonders hinweist.

Innerhalb des kristallinen Verbandes gibt es gewisse weniger regelmäßig geordnete Stellen, die als amorph bezeichnet werden und sich von den gut geordneten Gebieten nur durch weniger große Wirksamkeit der Wasserstoffbrückenbindung aufeinander unterscheiden. Die amorphe Zellulose ist auch als Kittstoff [1] zwischen den einzelnen kristallinen Gebieten, die bedauerlicherweise auch als Mizellen bezeichnet werden, angesehen worden, der vielleicht aus Hemizellulose besteht, was seine größere Wasserzugänglichkeit erklären würde. In dieses Gebiet kann Wasser leichter eindringen und von sich aus Wasserstoffbrückenbindungen zu den freier gelegenen Teilen der Zelluloseketten bilden, wodurch schließlich die Quellung zustande kommt. Sicherlich gibt es zwischen dem streng kristallinen und dem sogenannten amorphen Gebiet noch alle Arten von Übergängen, doch genügen diese beiden schon zur Erklärung der Vorgänge der Papierchromatographie. Weitere Ausführungen können bei *Hermans* [33] sowie bei *Schute* [69] nachgelesen werden, wo auch zahlreiche Literaturangaben gemacht sind.<sup>1</sup>

\*

<sup>1</sup> Vergleiche hierzu auch die Ausführungen von *L. Horner*, *W. Emrich* und *A. Kirschner* (Z. Elektrochem. 56, 987—995 [1952]), die auch zu dem Schluß kommen: „... daß der Verteilungsvorgang sich ganz bevorzugt in den amorphen Gebieten abspielt.“



Es ist verständlich, daß dieser Aufbau der Zellulose bei einer Deutung des Mechanismus während der papierchromatographischen Vorgänge berücksichtigt werden muß, wie dieses von *Schute* [69] auch konsequent durchgeführt wird. Auch frühere Autoren bezogen sich mehr oder weniger bei der Diskussion des Verteilungsvorganges hierauf und waren dabei gezwungen, Hypothesen über den Aufbau der stationären Phase zu entwickeln, die im folgenden kurz besprochen seien. *Consden*, *Gordon* und *Martin* [18] nahmen als stationäre Phase eine Wasserphase auf dem Papier an und sprachen von einem „Aussalzeffekt“ während der Papierchromatographie, ohne jedoch nähere Erläuterungen zu geben. Dieses geschah später durch *Martin* [50], der zunächst auf die quantitativ verschiedene Bindungsart von Wasser in der Zellulose hinwies, was später noch eingehender besprochen werden soll, und das durch die Bindung des Wassers an die Zelluloseketten entstandene Gefüge, insbesondere in der amorphen Region der Zellulosefasern, mit einer konzentrierten Lösung von Kohlenhydraten in Wasser verglich, wobei die bei der Reinigung und Aufarbeitung der Zellulose entstandenen Veränderungen (z. B. Oxydationen der Hydroxylgruppen zu Karboxylgruppen) die Neigung zur Bindung von Wasser und damit zur Bildung von Lösungen fördern sollten. Die stationäre Phase ist nach *Martin* vielleicht mit einer starken Glukoselösung oder besser einer solchen von löslichen Polysacchariden, vielleicht in Gel-Form, zu vergleichen, weshalb es nicht überraschend ist, daß auch mit Wasser mischbare Elutionsmittel verwendet werden können. So wird, wie *Martin* ausführt, eine konzentrierte Glukoselösung, z. B. mit wäßrigem Propanol, 2 Formen bilden, eine kohlenhydratreiche Phase mit relativ hohem Wasseranteil und eine andere, die einen relativ höheren Gehalt an organischen Lösungsmitteln besitzt. Diesen Vorgang nennt *Martin* später nicht mehr „Aussalzeffekt“, da dieser Ausdruck vielleicht zu stark an Ionenwechselwirkungen erinnert. Es sei hier daran erinnert, daß schon 20%ige Kalziumchloridlösung keine Mischung mit Propanol mehr eingeht, so daß bei konzentrierteren Lösungen dieses erst recht nicht der Fall sein wird.

Auch von anderen Autoren sind Vorstellungen über den Mechanismus der Verteilung und den Aufbau der stationären Phase an der Zellulose entwickelt worden. So trat *Meinhard* [54] für eine allgemeine Auffassung des Verteilungsvorganges ein, indem er schreibt (Übersetzung): „Es soll aber darauf hingewiesen werden, daß der Verteilungschromatographie-Mechanismus in einem mehr allgemeinen Sinne gültig ist. Es geht aus voneinander unabhängigen Versuchen allgemein hervor, daß das Haftenbleiben einer Flüssigkeit auf einer fest-flüssigen Oberfläche sich bis in eine Tiefe von etwa 100 Molekeln oder mehr erstrecken kann. In viskosen Flüssigkeiten kann eine solche Schicht als eine ‚stationäre‘ Phase angesehen werden. Ferner wird die Struktur der stationären Flüssigkeit deutlich durch die Nähe des Adsorbens verändert, wodurch die Ähnlichkeit mit einer nichtmischbaren, flüssigen Phase vervollständigt wird. Es ist daher verständlich, daß der Unterschied zwischen gewöhnlicher und Verteilungs-Chromatographie in erster Linie von der Auswahl der Medien und nicht von dem verwickelten Mechanismus abhängt.“

Die Ausführungen hinsichtlich des Mechanismus beim Verteilungsvorgang auf dem Papier von *Hanes* und *Isherwood* [32] in einer Arbeit über die „Trennung von Phosphorsäureestern auf dem Filtrierpapier“ fanden bei einer Reihe anderer Autoren Anklang. Sie stellten zunächst die auffällige brauchbare Verwendung sowohl von wenig als auch von in jedem Verhältnis mit Wasser mischbaren organischen Elutionsmitteln für ihre Zwecke fest und bezeichneten als wichtiges Merkmal eines chromatographischen Systems das Zusammenwirken einer hydrophilen festen Substanz — im Falle der Papierchromatographie ist es die Zellulose —, die eine bestimmte Menge Wasser aufgenommen hat, und einer mobilen Phase, die ihrerseits in einem bestimmten Verhältnis Wasser enthalten kann. Die Verfasser halten es für unzweifelhaft, daß das von der Zellulose aufgenommene Wasser in wichtigen Eigenschaften sich stark von denen des gewöhnlichen Wassers unterscheidet, und betrachten es als eine zu starke Vereinfachung, die stationäre Phase in solchen Systemen als flüssig anzusehen. Nach ihrer Ansicht besitzt das aufgenommene Wasser eine beträchtliche strukturelle Ordnung, z. B. als Ketten von Wassermolekeln, die miteinander und mit den Hydroxylgruppen der Zellulose in Form von Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind, so daß die stationäre Phase von einem Wasser-Zellulose-Komplex gebildet wird. Der Wassergehalt dieses Komplexes bei Einstellung des Gleichgewichtes mit den Komponenten der mobilen Phase während der Chromatographie wird stark von der Affinität der Komponenten der beiden Phasen zu Wasser abhängen. Daß Wasserstoffbrückenbindungen eine bedeutende Rolle bei chromatographischen Vorgängen spielen, konnte *Hoyer* [34] in einer Reihe von Arbeiten zeigen, auf die hier nur hingewiesen sei.

*Hanes* und *Isherwood* [32] glauben, daß die gelösten Molekel auf Grund ihres hydrophilen Charakters sozusagen in Konkurrenz mit den Wassermolekeln in den Wasserzellulose-Komplex aufgenommen werden können. Es würden also die gelösten Molekeln mit Hilfe ihrer hydrophilen Gruppen schwach an Wassermolekeln des Zellulose-Wasser-Komplexes gebunden sein; es könnte aber auch eine gelegentliche Bindung der gelösten Molekel direkt mit den Hydroxylgruppen der Zellulose zustande kommen. Sind verschiedenartige, gelöste Substanzen vorhanden, so hängt deren Trennung von den spezifischen Unterschieden ihrer Verteilung zwischen und damit von der Affinität zu den beiden Phasen ab. Als bestimmende Faktoren für die Affinität sehen *Hanes* und *Isherwood* [32] Größe und Gestalt der Molekel, Zahl, Lage und Charakter der hydrophilen Gruppen usw. an, so daß es verständlich ist, daß z. B. die Veränderung des Wassergehaltes in beiden Phasen eines Papierchromatogramms die Verteilung der gelösten Substanzen beeinflusst. Außerdem können vielleicht einige organische Elutionsmittel, die hydrophile Gruppen besitzen (z. B. Alkohole), um den Platz an dem Zellulosekomplex mit ebenfalls anwesendem Wasser oder hydrophilen gelösten Substanzen in Konkurrenz treten. Die Frage, ob hierin eine Verteilung oder eine Adsorption zu sehen ist, betrachten die Autoren als formal, die je nach Definition dieser Begriffe zu beantworten sei. Hinsichtlich der Assoziation einer gelösten Molekel mit Wasser des amorphen Zellulosegebietes entwickelt *Martin* [50] ähnliche Auf-

fassungen, der aber dann doch Wert darauf legt, den Hauptvorgang als Verteilung zu deuten.<sup>1</sup>

Die Vorstellung von *Hanes* und *Isherwood* [32] spielte auch in einer Arbeit von *Bentley* und *Whitehead* [5] eine Rolle, die sich mit der Verwendung von mit Wasser mischbaren Elutionsmitteln bei der papierchromatographischen Trennung von Aminosäuren befaßte, was an Stärkesäulen schon von *Moore* und *Stein* [57] mit interessanten Ergebnissen vorgenommen worden war. Sie variierten Art der Elutionsmittel und deren Anteil an Wasser, wobei scharf definierte Flecke innerhalb des Bereiches von 20–40% Wassergehalt als Optimum erhalten wurden (s. Tabelle im Original). Die Verfasser wiesen auf die sehr gute Übereinstimmung ihrer Befunde mit der Arbeitshypothese von *Hanes* und *Isherwood* hin, die sich darin zeige, daß für ein gegebenes Elutionsmittel ein Anwachsen von dessen Wassergehalt eine größere Wanderungsgeschwindigkeit der gelösten Substanz (im Falle der Aminosäuren! Es gibt in der Praxis auch — je nach gelöster Substanz — den umgekehrten Fall, was die Verfasser nicht erwähnen) zur Folge haben müßte, da deren Affinität zu Wasser infolge des erhöhten Wasseranteils in der mobilen Phase nicht mehr ausschließlich dem Zellulose-Wasser-Komplex, sondern auch den Wassermolekeln der mobilen Phase gehöre. Interessanterweise erwähnen auch diese Autoren, daß ein hoher Wassergehalt der mobilen Phase (80–90%) bei den Aminosäuren einen  $R_f$ -Wert von fast, aber doch nicht ganz 1 bewirkt, was auf eine zeitweilige Aufnahme der Aminosäuren in den Zellulose-Wasser-Komplex deutet, wodurch die etwas verzögerte Wanderungsgeschwindigkeit zustande kommt.

Bei den als mobile Phase verwendeten Alkoholen ist ein ansteigendes Konkurrieren um die Anlagerung an den Zellulose-Wasser-Komplex zu erwarten. Das im gleichen Sinne vorhandene Steigen des hydrophilen Charakters der Alkohole Propanol-Äthanol-Methanol ist aus der steigenden Tendenz der gelösten Aminosäuren zu ersehen, in die mobile Phase überzugehen und daher höhere  $R_f$ -Werte zu zeigen (s. dazu Tabellen und graphische Darstellungen im Original). Es sei von uns darauf hingewiesen, daß sich bei Zugrundelegung der allgemeinen Formel für Alkohole  $C_nH_{2n+1}OH$  für den Wert  $n = 0$  die Verbindung mit der stärksten Tendenz zum Zellulose-Wasser-Komplex ergeben muß, was beim Wasser ( $n = 0$  nach obiger Formel ergibt Wasser) tatsächlich der Fall ist.

<sup>1</sup> In ihrer Veröffentlichung: „Experimenteller Beitrag zum Mechanismus der Papierchromatographie“ (Z. Elektrochem. 56, 987–995 [1952]) wiesen *L. Horner*, *W. Emrich* und *A. Kirschner* die Beteiligung der Wasserkomponente am Aufbau des Zellulose-Wasser-Komplexes durch Messung der Refraktionsänderung des Elutionsmittels nach, das durch Filtrierpapier von stets gleicher Größe, Gewichtsmenge und Art gelaufen war: Die ersten Anteile des Ablaufenden enthielten weniger Wasser als die späteren, die einem Endwert zustrebten, bei dem also dem Elutionsmittel kein Wasser zum Aufbau des Zellulose-Wasser-Komplexes mehr entnommen wurde. 80%iges und 90%iges Butanol gaben in starkem Maße Wasser an Zellulose ab, ebenso 75,8%iges bzw. 90%iges Phenol (auch jodometrisch bestätigt), 9,3%iges bzw. 5%iges und 2,5%iges Butanol dagegen gaben kein Wasser ab. Überraschenderweise zeigten aber 5%iges bzw. 2,5%iges Phenol eine bevorzugte Fixierung nicht des Wassers, sondern des Phenols an die Zellulose, so daß also zunächst ein wasserreicheres Gemisch aus dem Filtrierpapierstreifen abfloß.

Auch die Prüfung von in jedem Verhältnis mischbaren organischen Lösungsmitteln im Gemisch mit Wasser ergab z. B. bei  $\alpha$ -Picolin (60–15%ige Lösungen in Wasser) und Isopropanol (80–25%ige Lösungen in Wasser) die Beteiligung des Wassers der Elutionsflüssigkeit am Aufbau des Wasser-Zellulose-Komplexes. Bei Isopropanol machte sich allerdings schon dessen zelluloseaffiner Charakter bemerkbar, so daß dieser Alkoholsicherlich auch am Aufbau des Zellulose-Lösungsmittel-Komplexes beteiligt ist.



Schließlich weisen die Verfasser noch darauf hin, daß bei allgemeiner Annahme dieses Mechanismus für nur wenig mit Wasser mischbare Elutionsmittel deren Zusammensetzung und die des Zellulose-Wasser-Komplexes nur innerhalb gewisser Grenzen schwanken dürfte. Es wird daher in solchen Systemen zu einer Verteilung kommen, deren Ergebnisse mit denen eines Modellversuches mit den gleichen Flüssigkeiten gut übereinstimmen, wie schon Versuche von *Consden*, *Gordon* und *Martin* [18] bei Verwendung von wassergesättigtem *n*-Butanol/Wasserphase bewiesen haben.

Analoge Betrachtungen haben *Jermyn* und *Isherwood* [37] durchgeführt, worüber später bei der Besprechung des Zusammenhanges zwischen  $R_f$ -Wert und chemischer Konstitution berichtet werden soll.

Zweifel an den Anschauungen von *Hanes* und *Isherwood* [32] sowie von *Bentley* und *Whitehead* [5] äußerten *Munier* und *Macheboeuf* [60] in einer Arbeit über die Papierchromatographie von Alkaloiden mit wassermischbaren Elutionsmitteln auf Grund ihrer experimentellen Ergebnisse. Sie neigen zu der Annahme, daß die Chromatographie mit Hilfe von wassermischbaren Flüssigkeiten als ein spezieller Fall der Verteilungschromatographie angesehen werden sollte, bei dem die stationäre Phase sich im Laufe der Wanderung der mobilen Phase ständig in ein Gleichgewicht bringen will und das Papier eine vollkommene Mischung der beiden sonst mischbaren Phasen verhindert. Doch äußern sich die Verfasser nicht eingehender darüber, wie dieser Vorgang im einzelnen zu denken sei, sondern legen, wie sie selbst sagen, mehr Wert auf die Praxis als auf die Interpretation.

\*

Alle diese Betrachtungen über das Vorliegen von Adsorption oder Verteilung zwischen 2 Phasen auf dem Papier während der Chromatographie waren aber, wie bereits erwähnt, sozusagen als Nebenprodukt bei der Trennung von in der Praxis interessierenden Präparaten entstanden. Es ist daher das besondere Verdienst von *Schute* [69], den Vorgängen an sich seine Aufmerksamkeit gewidmet und dazu sehr interessante Versuche angestellt zu haben, denen im folgenden ein breiter Raum gewidmet sein soll.

Natürlich hat *Schute* auch auf den Erkenntnissen und Versuchen früherer Autoren aufbauen können, die er im einzelnen zitiert und die auch hier wiedergegeben seien. So war z. B. das Verhalten der Zellulose gegen Dämpfe und Flüssigkeiten schon eingehend untersucht worden, wobei hier zunächst dasjenige gegen Wasserdampf besonders interessieren soll, da die Aufnahme von Wasser durch das Papier besonders bei Gültigkeit der Verteilungstheorie (zum Aufbau der stationären Phase) von großer Wichtigkeit für den Ablauf der Papierchromatographie sein muß. Durch Bestimmung des aufgenommenen Wassers aus einer Wasserdampfumgebung, deren Wasserdampfgehalt man variieren kann, war die Absorptionsisotherme der untersuchten Zellulose erhalten und graphisch dargestellt worden (System: Feuchtigkeitsgehalt der Umgebung/Feuchtigkeitsgehalt der Zellulose). Bei der Bindung des Wassers muß man wohl zunächst an die Bildung einer monomolekularen, später polymolekularen Schicht denken. Es ist bekannt, daß

diese Wasseraufnahme zunächst unter erheblicher Wärmeentwicklung vor sich geht, weshalb sie wohl mit Recht als Hydratisierung der Zellulose bezeichnet wird. Beim Herantreten von weiteren Wassermolekeln nimmt die Bindungsfestigkeit und damit auch die Wärmeentwicklung ab — analog der Hydratisierung eines Ions oder eines Eiweißkörpers in Lösung —, so daß das Wasser sich in der Zellulose in verschiedener Bindungsfestigkeit und damit verschiedener Affinität zu von außen herantretenden Substanzen befindet, was für Aufbau und Wirkung der stationären Phase von großer Wichtigkeit ist. Bei weiterem Eindringen von Wasser in die Zellulose tritt Quellung ein, ein Prozeß, der mit einer Auflösung des amorphen Teiles der Zellulose, die davon in der Hauptsache betroffen wird, verglichen worden ist. Eine vollkommene Auflösung der Ketten kann nach *Martin* [50] nicht eintreten, da sie in der nicht hydratisierten, kristallinen Gegend, aber auch in den Übergangsregionen zu stark durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. *Schule* [69] meint, daß bei einem relativen Dampfdruck von 1 bis 60% in der die Zellulose umgebenden Atmosphäre die oben erwähnte Hydratbildung zustande kommt und hat dazu einige Versuche durchgeführt. Zur quantitativen Bestimmung dieses festgebundenen Wassers waren vorher schon Versuche gemacht worden. So hatte *Champetier* [17] auf Grund seiner Versuche mit Natriumthiosulfatlösung, die er auf Zellulose einwirken ließ, festgestellt, daß nach dem Trocknen die Zellulose stets etwas Wasser zurückhielt, das er bei der unbehandelten Zellulose zu  $\frac{1}{2}$  Mol Wasser auf 1 Mol Glukose, bei merzerisierter Zellulose zu 1 Mol Wasser auf 1 Mol Glukose bestimmte. Bei einem Mol. Gew. der Glukose von 180 und Wasser von 18 enthält also die unbehandelte Zellulose etwa 5% Wasser, was mit dem von *Hermans* [33] angegebenen Wert von 5,9% ziemlich gut übereinstimmt. Gegen die angegebene Deutung derartiger Versuche, wie sie auch *Hermans* [33] angibt, wenden sich auf Grund ihrer Versuche, die hier im einzelnen nicht wiedergegeben werden sollen, *Farrar*, *Neale* und *Williamson* [26, 62], wobei nach Meinung dieser Autoren der Aufbau der stationären Phase stark von gleichzeitig anwesendem Salzgehalt abhängig sei. Auf die sehr interessanten Ausführungen dieser Autoren sei hier nur hingewiesen.

Ebenso wie die Einwirkung der Dämpfe von Wasser auf Zellulose — diese Einwirkung findet ja tatsächlich statt, wenn Zellulose z. B. an offener Luft liegt, obwohl sie als (luft-)trocken angesprochen wird — interessiert auch die Einwirkung von Dämpfen organischer Flüssigkeiten, wie sie zur Elution in der Papierchromatographie verwendet werden, auf Zellulose. Hier war, ebenfalls schon früher, gefunden worden, daß z. B. Alkohole in Dampfform von i. V. getrockneter Zellulose um so schlechter aufgenommen werden, je geringer der Hydroxylanteil der Molekel ist, so daß z. B. aus reinen Blutanoldämpfen keine Aufnahme mehr stattfindet, dagegen noch relativ viel aus Methanoldämpfen, während an Wasserdämpfen im Vergleich dazu noch weit mehr aufgenommen wird. Diese Verhältnisse ändern sich jedoch, wenn nicht i. V. getrocknete, sondern lufttrockene (also Wasser enthaltende) Zellulose (Filtrierpapier) verwendet wird. Auf die erheblich höhere Aufnahmefähigkeit der Kunstseide an Wasser- und

Methanoldämpfen sei hier nur hingewiesen, was durch den größeren Anteil an amorphen Gebieten als in der gewöhnlichen Zellulose zu erklären ist (Versuche von *Kanamaru* und *Chao* [39], zitiert nach *Schute* [69]).

Die bisher besprochene Einwirkung der *Dämpfe* von Lösungsmitteln ist aber nicht in gleichem Maße wichtig wie die der Lösungsmittel in flüssiger Form. Hier sind es besonders die Versuche von *Staudinger* und *Dohle* [77, 23], die richtungsweisend für das Verständnis vieler Erscheinungen in der Papierchromatographie sind und von *Schute* [69] auch eingehend besprochen werden. *Staudinger* und *Dohle* [77] ließen die Zellulose zunächst mit Wasser quellen und verdrängten dann das aufgenommene Wasser in der Zellulose z. B. durch Alkohole, diese oft weiterhin durch Kohlenwasserstoffe usw., und stellten fest, daß bei dem darauffolgenden Trocknen ein gewisser Anteil der letzten Behandlungsflüssigkeit von der Zellulose hartnäckig zurückgehalten wurde, z. B.

Wasser . . . . .	0,0%,
Äthanol . . . . .	1,6%,
Pyridin . . . . .	2,7%,
Hexan . . . . .	4,9%.

Die Erklärung dieser Vorgänge ist einfach, wenn man daran denkt, daß durch das zunächst eindringende Wasser die im amorphen Zellulosegebiet recht schwachen Wasserstoffbrückenbindungen der einzelnen parallel liegenden Zelluloseketten beseitigt werden können. Durch die Mischbarkeit des Wassers mit Alkoholen, die ihrerseits wieder mit anderen, mit Wasser schon nicht mehr mischbaren Flüssigkeiten mischbar sind, z. B. Kohlenwasserstoffe, gelingt es, organische Flüssigkeiten in die amorphen Gebiete der Zellulose einzuschleusen. Wird nun aber in gleichem Maße, wie die organischen Flüssigkeiten, z. B. Butanol oder Hexan, in die Zellulose eindringen, das Wasser entfernt, so besitzen die organischen Flüssigkeiten — auf Grund des Fehlens oder des geringen Anteils an Hydroxylgruppen, die die Wasserstoffbrückenbindungen öffnen könnten, die sich hinter dem entweichenden Wasser wieder geschlossen haben — sozusagen keinen Schlüssel mehr für die Wasserstoffbrückenbindungen, sie werden von der Zellulose eingeschlossen (inkludiert. Vorgang auch als Inklusion bezeichnet) und können nicht mehr entweichen. Verständlicherweise wird die eingeschlossene Menge z. B. in der homologen primären Alkoholreihe mit dem Sinken des prozentualen Anteils der Hydroxylgruppen steigen, daher bei Kohlenwasserstoffen am größten sein. Das amorphe Gebiet der Zellulose kann daher für solche Flüssigkeiten nur mit Hilfe anderer Flüssigkeiten, die dazu in der Lage sind (z. B. Wasser oder Methanol), zugänglich gemacht werden. Äthanol wird zu einem geringen, Propanol zu einem sehr großen Teil eingeschlossen. Da aber diese Flüssigkeiten stark hygroskopisch sind, wird schon eine Berührung mit lufttrockener Zellulose, wie *Schute* bemerkt, das Eindringungsvermögen vergrößern, weshalb solche Versuche sehr schwierig durchzuführen sind. Andererseits enthält in der Praxis verwendetes Papier immer etwas Wasser, weshalb diese Erscheinungen sich bei wasserähnlicheren (z. B. Methanol, Äthanol) Elutionsmitteln nicht so stark zeigen wie bei den nicht wasser-



ähnlichen Lösungsmitteln (Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Benzin). Den Einschluss von Butanol konnte *Schute* durch Befeuchten des mit Butanol eluierten und danach getrockneten und dadurch geruchlos gewordenen Filtrierpapiers mit Wasser nachweisen: Infolge der Verdrängung des bis dahin in der Zellulose eingeschlossenen Butanols durch Wasser trat der Geruch nach Butanol wieder sehr stark auf.

Mit dem gleichen Ziel festzustellen, wann eine organische Flüssigkeit in der Zellulose (Filtrierpapier) eingeschlossen wird, führte *Schute* eine Reihe von Versuchen mit den einzelnen in der Praxis als Elutionsmittel verwendeten organischen Lösungsmitteln auf über CaO getrocknetem Filtrierpapier durch, in denen er eine leicht nachzuweisende Verbindung — es war Fluorenon — löste. Die Einzelheiten der Versuchsführung, die in ihrer Einfachheit ebenso überraschend wie in ihrem Ergebnis überzeugend sind, müssen im Original nachgelesen werden. *Schute* konnte in diesen Versuchen feststellen, daß nur Methanol und Ameisensäure (Wasser war natürlich nicht versucht worden) in die amorphe Zellulose eingedrungen waren, während dieses bei den anderen untersuchten Lösungsmitteln (Hexan, Dekalin, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Äther, Azeton, Propanol, Diäthylamin, Äthanol, Pyridin, Eisessig) nicht der Fall war.

Bei Wiederholung der gleichen Versuche, aber unter Verwendung von lufttrockenem, also wasserhaltigem Papier — das Wasser brauchte dabei nur als Hydratwasser aufzutreten —, war außer bei Methanol und Ameisensäure noch bei einigen anderen (Azeton, Propanol, Diäthylamin, Äthanol, Pyridin, Eisessig) ein, wenn manchmal auch schwaches, Eindringen in die amorphen Gebiete der Zellulose und damit ein Einschluss festzustellen. Aber auch bei diesen Versuchen zeigte Äthanol wenig, Propanol ein noch geringeres Eindringungsvermögen für Zellulose (amorphe Regionen). Diese Versuche sind von großer Wichtigkeit, da sie beweisen, daß es von Bedeutung sein kann, in welchem Lösungsmittel die Untersuchungssubstanz vor dem Aufsetzen auf das Papier gelöst wird. Ist dieses z. B. Wasser oder Methanol, das in die amorphen Regionen eindringt, und wird nach dessen Verdampfen mit einem nicht in diese Gebiete eindringenden Elutionsmittel gearbeitet, z. B. Chloroform oder Benzol, so kann eine papierchromatographische Wanderung der gelösten Substanz auf dem Papier gar nicht einsetzen, da das Elutionsmittel an diese gar nicht herankommt.

\*

Eine besondere Versuchsreihe widmete *Schute* der *Einwirkung* von *Alkoholen* auf *lufttrockenes* Papier, also Verhältnissen, wie sie z. B. bei der Elution eines Papierchromatogramms mit Äthanol auftreten. Zu diesem Zweck ließ er wasserarme Alkohole ( $C_1$  bis  $C_4$ ) auf bekannte Mengen lufttrockenen Filtrierpapiers einwirken, bestimmte den Wassergehalt in den Alkoholen vor und nach der Einwirkung mit Hilfe der sehr empfindlichen Karl-Fischer-Methode einerseits sowie das Gewicht des Papiers vor und nach der Behandlung andererseits. Es war zu vermuten, daß ein Wasseraustausch bis zur Gleichgewichtseinstellung zwischen organischem Lösungsmittel und Zellulose stattfinden würde, und diese Vermutung konnte durch die Feststellung bestätigt werden, daß eine Berührung von luft-

trockenem Papier mit wasserfreiem Alkohol einen Wasserentzug aus dem Papier durch den Alkohol bewirkt, und zwar um so geringer, je weniger hydrophil der Alkohol ist, d. h. je höher er in der homologen Reihe steht. Dieser Wasserentzug tritt bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes ein, wird also auch noch vor sich gehen, wenn Alkohol mit geringem Wassergehalt, also nicht nur wasserfreier, auf lufttrockenes Filtrierpapier einwirkt. Bei höherem Wassergehalt im Alkohol findet umgekehrt eine Wasserabgabe an die Zellulose statt, wobei also Konzentrierung des Alkohols eintritt. *Schute* führt dazu einen Versuch an, in dem er feststellte, daß Propanol mit einem ursprünglichen Gehalt von 48,6% Wasser nach einigen Tagen, in denen eine Einwirkung auf Filtrierpapier stattfand, nur noch 45,2% Wasser enthielt, was ebenfalls auf Austausch und Gleichgewichtseinstellung zwischen Alkohol und Zellulose hinweist. Nach *Schute* ist dabei der Wassergehalt der von der amorphen Zellulose gehaltenen Phase stets größer als der der mobilen Phase, was auf Grund des stärker hydrophilen Charakters der Zellulose auch einzusehen ist. Hierdurch ist es auch verständlich, daß der Wassergehalt der Außen (mobilen)-Phase um so niedriger sein wird, je höher der verwendete Alkohol in der homologen Reihe steht, wozu *Schute* auch noch mathematische Erläuterungen gibt.

Als Folgerung aus den angeführten Versuchen von *Schute* ist zu schließen, daß infolge des ständigen Austausches von Wasser zwischen mobiler und stationärer Phase der  $R_f$ -Wert einer Substanz in solchen Fällen theoretisch keine Konstante sein kann. Dieses wird besonders bei kurzer Laufstrecke der mobilen Phase auf dem Chromatogramm zutreffen, während sich diese Tatsache bei längerer Laufstrecke und besonders bei kleinerem  $R_f$ -Wert nicht so stark bemerkbar machen dürfte (s. zur Frage der  $R_f$ -Werte auch: *Zimmermann* [84]).

Als weitere Folgerung dieser Versuche für die Praxis ist auf die Rolle des Einhängens des Filtrierpapiers vor der Elution in den Dampf des Elutionsmittels (von *Schute* „Akkommodation“ genannt) hinzuweisen. Hierdurch kann bereits eine teilweise Einstellung des Gleichgewichts im angeführten Sinne bewirkt werden, weshalb bei der darauf folgenden Elution eine geringere Änderung der Zusammensetzung des Elutionsmittels erfolgen wird. Auf die Rolle des Einhängens von Filtrierpapier in den Dampf des Elutionsmittels wird später nochmals eingegangen.

\*

In diesem Zusammenhang sei noch eine besondere Erscheinung behandelt, die während der Elution bei der Papierchromatographie auftreten kann, nämlich die zuweilen auftretende Entmischung der Komponenten des Elutionsmittels. *Schute* führt als Beispiel die Elution mit einem Gemisch aus Methanol (20%) und Tetrachlorkohlenstoff (80%) an. Diese zeigt nach einiger Zeit eine zweite Front, zu deren Erklärung angenommen werden muß, daß das Methanol dem lufttrockenen Papier allmählich soviel Wasser entzieht, daß die dadurch resultierenden Komponenten Methanol, Wasser und Tetrachlorkohlenstoff nicht mehr vollständig mischbar sind, daher zwei Phasen bilden, die mit verschiedener Schnelligkeit wandern und daher zwei Fronten aufweisen. Ähnliche Vorgänge sind

wiederholt beschrieben worden, besonders wenn Mineralsäuren oder andere stark hydrophile Substanzen im Elutionsmittel enthalten waren, so z. B. von *Lederer* [45] bei der Trennung von Edelmetallen mit *n*-Salzsäure gesättigtem Butanol oder von *Romano* [66] bei der Trennung von Alkaloiden. Von diesen beiden Autoren wurden interessanterweise die einzelnen Substanzen zur Errechnung des  $R_f$ -Wertes auf die zweite Front bezogen, wodurch diejenigen Substanzen, die nach der Elution zwischen der ersten und zweiten Front lagen, einen  $R_f$ -Wert erhielten, der größer als 1 war.

Mit der Entmischungserscheinung („*démixion*“) haben sich besonders *Munier* und *Macheboeuf* [59] beschäftigt, worauf von uns an anderer Stelle ausführlich eingegangen wurde [9]. Zur Erklärung der Entmischungserscheinung der Versuche von *Munier* und *Macheboeuf* kann aber eine Entziehung von Wasser aus dem Papier nicht als wahrscheinlich angenommen werden, da die Verfasser dem Elutionsmittel bei dessen Zusammenstellung Wasser bis zur Sättigung und ersten Trübung zugaben und es erst dann verwendeten. Es ist vielmehr anzunehmen, daß die stark hydrophilen Eigenschaften des gelösten Chlorwasserstoffes — bei Butanol + Salzsäure als Elutionsmittel — diesen in größerer Menge in die wäßrige stationäre Phase bringen. Dadurch sinkt die Aufnahmefähigkeit der organischen Flüssigkeit für Wasser — über den Zusammenhang von Säuregehalt und Wasseraufnahmefähigkeit z. B. im Butanol haben *Munier* und *Macheboeuf* recht interessante Angaben gemacht —, und es tritt die Bildung zweier Schichten auf dem Papier auf. Die Verfasser erklären abweichend von der gegebenen Deutung das Zustandekommen dieser Entmischung dadurch, daß die stationäre Phase nach der Berührung mit der organischen Flüssigkeit mengenmäßig so stark vergrößert wird, daß nur ein Teil des Wassers gehalten werden kann, während ein anderer aus der stationären Phase austritt und als zweite Schicht auf dem Papier erscheint.

Wir selbst [10] haben eine interessante Wechselwirkung von Säuregehalt (Salzsäure) des organischen Elutionsmittels und Höhe des  $R_f$ -Wertes von Untersuchungssubstanzen (z. B. Atropin, Skopolamin usw.) gesehen. Es ist allgemein bekannt, daß mit steigendem Säuregehalt z. B. an Salzsäure eines organischen Elutionsmittels auch die  $R_f$ -Werte der Untersuchungssubstanz steigen. Wir fanden, daß diese Abhängigkeit aber nur dann linear verläuft, wenn das verwendete Elutionsmittel im Sinne der Arbeitsweise von *Munier* und *Macheboeuf* angesäuert und dann mit Wasser gesättigt wurde. Dagegen wird die Abhängigkeit der Höhe des  $R_f$ -Wertes von der Menge der zugesetzten Säure durch eine wellenförmige Kurve dargestellt, die in ihrem mittleren Teil ein Minimum besitzt, wenn zum wassergesättigten Butanol nur abgemessene Mengen an Salzsäure, dann aber kein weiteres Wasser bis zur Sättigung zugesetzt wurde. Da die experimentelle Seite zur Klärung dieser Frage noch nicht abgeschlossen ist, soll hierüber später berichtet werden.

\*

In weiteren Versuchen beschäftigte sich *Schute* mit den *Phasen auf dem Papier*, die zum Verteilungsvorgang gehören. Er beschränkt sich dabei nicht auf die Begriffe Flüssig/Flüssig bei der Verteilung, sondern faßt diese allgemein als



einen Prozeß auf, in dem die gelöste Substanz zwischen stationärer und mobiler *Volumenphase* verteilt wird, ist also dadurch — den schon geschilderten Anschauungen von *Hanes* und *Isherwood* [32] sehr nahe kommend — nicht mehr an den Aggregatzustand der einzelnen Phasen gebunden. Er sieht in der Wahrscheinlichkeit, daß in dem amorphen Zellulosegebiet mit seiner stationären Phase nicht immer vollkommenes Vermischen mit der strömenden Flüssigkeit stattfindet, die Möglichkeit des Bestehens von 2 Phasen, zwischen denen ein Austausch stattfindet. Nach *Schute* ist also ein Verteilungssystem immer zu erwarten, wenn eine Flüssigkeit in die amorphen Gebiete der Zellulose eingedrungen ist — was aber viele Flüssigkeiten nur mit Hilfe anderer, Hydroxylgruppen enthaltender Flüssigkeiten vermögen —, worauf mit einer zweiten, eventuell der gleichen, eluiert wird.

Diese Verhältnisse untersuchte er zunächst an Substanzen, die möglichst keine Komplikationen mit sich bringen, nämlich Wasser als Elutionsmittel (aus dem sich gleichzeitig die stationäre Phase aufbaute) und verschiedenen Zuckerarten (Glukose, Fruktose, Laktose, Xylose), die wasserlöslich sind und keine Schwierigkeiten durch Dissoziation bereiten, worauf später noch eingegangen wird. Die Durchführung der Versuche geschah auf lufttrockenem wie auf Papier, das 40 Stunden lang Wasserdämpfen bei Zimmertemperatur ausgesetzt war („akkommodiert“). Es wurde gefunden, daß der absolute Wert der untereinander fast gleichen  $R_f$ -Werte der einzelnen Zucker, deren Filtrierpapier vor der Elution den Wasserdämpfen ausgesetzt war, erheblich geringer (0,66) war als der der Versuchsreihe mit lufttrockenem Papier (0,90). Durch die Behandlung mit Wasserdämpfen war also bereits eine stationäre Phase vor der Elution aufgebaut worden, wie dieses auch schon in der vorliegenden Arbeit erwähnt wurde. Daher herrschten hier andere Verteilungsverhältnisse als in unbehandeltem Papier. Da in beiden Fällen der Verteilungskoeffizient  $\alpha$  der gleiche ist — mobile und stationäre Phase bestehen aus Wasser —, mußte auf Grund der von *Consden*, *Gordon* und *Martin* [18] eingeführten Beziehung zwischen  $\alpha$ -,  $R_f$ -Wert und dem Quotienten  $\frac{A}{A_L}$  eine Veränderung dieses Quotienten erfolgt sein.

Analoge Versuche führte *Schute* mit Alkoholen, besonders mit Methanol, durch, wobei er die interessante Feststellung machte, daß auch hier mehr oder weniger abgerundete Flecke erschienen. Die fast runde Form dieser Flecke deutete auch hier auf das anteilmäßig sehr viel größere Vorliegen eines Verteilungsvorganges hin, da eine ausschließliche Adsorption sicherlich zu starker Schwanzbildung geführt hätte. Interessanterweise wuchs diese Kreisform noch, wenn das verwendete Filtrierpapier vor dem Versuch den Methanoldämpfen ausgesetzt wurde (16 Stunden bzw. 120 Stunden). Die Tatsache, daß auch bei Verwendung von (absolutem!) Methanol als Elutionsmittel ein beträchtliches Sinken der  $R_f$ -Werte auftritt, wenn das Filtrierpapier vor dem Versuch den Methanoldämpfen ausgesetzt wurde, war ein Hinweis auf den Aufbau der stationären Phase mit Hilfe von Methanol, das sicherlich infolge seiner Wasserähnlichkeit dazu noch in der Lage ist, während diese Fähigkeit mit sinkendem Hydroxylanteil in der homologen Reihe der Alkohole schnell verlorengeht.

In etwa analoger Weise wie bei den Versuchen mit Wasser als Elutionsmittel lassen sich auch für Methanol als mobile Phase die Werte für  $\frac{A_s}{A_L}$  errechnen und experimentell nachprüfen. Dabei ist festzustellen, daß die  $\alpha$ -Werte voneinander verschiedener Verbindungen einander um so ähnlicher werden, je länger das Papier den Dämpfen des Elutionsmittels ausgesetzt wird. Dieses wird verständlich, wenn man annimmt, daß durch das längere Eindringen des Methanols in die amorphen Zellulosegebiete deren Inhalt immer methanolähnlicher wird.

Eine recht interessante Wahrnehmung machte *Schute* bei der Elution von Fluoren, einer Substanz, die sich in sehr vielen Lösungsmitteln löst, darunter auch Alkoholen, mit wasserfreien Alkoholen bei Verwendung von Filtrierpapier, das vor dem eigentlichen Versuch längere Zeit den Dämpfen des verwendeten Alkohols ausgesetzt war. Bei Verwendung von Methanol trat gar keine, bei Äthanol eine geringe, bei Propanol dagegen eine sehr starke Schwanzbildung auf, die bei Butanol wieder zurückging und bei Amylalkohol fast verschwunden war. *Schute* glaubt, daß hierfür eine einfache Erklärung durch Adsorption nicht ausreichend sei. Vielmehr ist zwar ein Verteilungsvorgang zwischen stationärer und mobiler Phase anzunehmen, es tritt aber außerdem eine mit der „Hysterese“, die vom Verhalten des Eisens beim Magnetisieren her bekannt ist, verwandte Erscheinung auf dem Papier ein. Es sei darauf hingewiesen, daß diese Erscheinung schon bei trockener Zellulose beobachtet worden war, die sich in einer Umgebung kontinuierlich steigenden Wasserdampfdruckes befindet. Die Zellulose enthält dabei nach Einstellung des Gleichgewichtes (Absorptionsisotherme) eine kleinere Wassermenge als eine zunächst maximal gesättigt gewesene Zellulose, die in eine Umgebung mit kontinuierlich fallendem relativem Dampfdruck gebracht wird und zur Gleichgewichtseinstellung daher Wasser an diese abgibt (Desorptionsisotherme). Diese Erscheinung läßt sich auch zur Deutung der verschiedenen Schwanzbildung, wie sie bei Verwendung der einzelnen Alkohole oben erwähnt wurde, heranziehen, da es sich in beiden Fällen um das Zurückbleiben der verwendeten Flüssigkeit (bei Wasser in Dampfform) handelt. Während Methanol noch aus eigenem Vermögen, wie oben dargelegt wurde, die stationäre Phase auszubilden imstande ist, ist dieses bei den weiteren Alkoholen in nennenswertem Maße nur mit Hilfe von Wasser der Fall (s. Versuche von *Staudinger* und *Dohle* [77, 23]), wie es in geringer Menge im Filtrierpapier vorhanden ist. Die stationäre Phase wird also bei Anwendung von wasserfreiem Propanol als Elutionsmittel schon schlecht, bei Butanol und Amylalkohol praktisch kaum noch entwickelt sein. In Propanol gelöste Substanz wird also noch, wenn auch in geringer Menge, in die amorphen Zellulosegebiete eindringen, während dieses bei Butanol und Amylalkohol fast ganz unmöglich ist. Während aber das Eindringen mit Hilfe des im Filtrierpapier vorhandenen Wassers für Äthanol, Propanol und Butanol — wenn auch in sich steigender Schwierigkeit — noch möglich ist, ist ein Austritt nach *Schutes* Auffassung für Äthanol schon nicht mehr einfach und für Propanol sehr schwer, da der Schlüssel für die Ausgangspforte — das Wasser — zum Aufbrechen der an sich schwachen

Wasserstoffbrückenbindungen fehlt. Mit den Alkoholen bleiben aber auch die darin gelösten Substanzen in den amorphen Teilen der Zellulose zurück. Dieses muß bei Propanol zu besonders starker Schwanzbildung führen, da Äthanol — bei Gegenwart von geringen Mengen Wasser, wie es in lufttrockener Zellulose vorhanden ist — noch aus dem amorphen Teil der Zellulose austreten, also wandern kann, während Butanol, auch bei Gegenwart von Wasser, kaum noch hier eindringt, die gelöste Substanz also auch kaum eindringen und zurückgehalten werden kann. Aus diesen Überlegungen folgt, daß bei Zusatz von Wasser zu Propanol die Schwanzbildung aufhören muß, was nach *Schute* auch tatsächlich der Fall ist (20% Wasser bei sogar 300  $\mu$ g Untersuchungssubstanz bewirken noch normale Flecke). Durch diesen Zusatz wird wahrscheinlich die stationäre Volumenphase so gut für den Verteilungsvorgang entwickelt, daß Hysterese nicht mehr eintreten kann. Diese Befunde gelten nur für Papier, das längere Zeit den Dämpfen des verwendeten Alkohols ausgesetzt war, während nicht vorbehandeltes Papier kaum noch Schwanzbildung bei Fluorenol zeigt: Es tritt eben nur noch eine Wanderung über die Oberfläche des Papiers, aber keine Verteilung mit der bestehenden wäßrigen stationären Phase ein.

Der Verwendung von *höheren* Alkoholen als Elutionsmittel auf Papier, das den Dämpfen dieser Alkohole längere Zeit ausgesetzt war, widmet *Schute* noch einige Betrachtungen. Das in Wasser unlösliche, von ihm zu Versuchszwecken verwendete Azobenzol zeigt auf „akkommodiertem“ Papier mit Amylalkohol nicht den erwarteten  $R_f$ -Wert von nahezu 1, sondern nur von 0,8, wobei ein runder Fleck auftrat, was auf einen Verteilungsvorgang und nicht Adsorption deutete. Die dazu notwendige stationäre Phase kann aber nicht ausschließlich aus dem amorphen Zellulosegebiet gebildet werden, da dieses nur Wasser enthalten kann — Amylalkohol kann, wie dargestellt wurde, nicht in das amorphe Zellulosegebiet eindringen. Mit Wasser aber als Verteilungsphase müßte infolge der schlechten Löslichkeit von Azobenzol in Wasser und guter Löslichkeit in Amylalkohol ein  $R_f$ -Wert von etwa 1,0 resultieren. Daraus folgt, daß in diesem Fall als stationäre Phase in der Hauptsache etwas anderes wirken muß, und *Schute* glaubt hierfür die Mitwirkung der kleinen und engen Kapillaren des Papiers verantwortlich machen zu können. Daß Kapillarkondensation bei der Einwirkung der Dämpfe von Amylalkohol auf Filtrierpapier eintritt, glaubt *Schute* aus der größeren Wandergeschwindigkeit bei der Elution mit Amylalkohol zu ersehen, wenn das verwendete Papier längere Zeit den Amylalkoholdämpfen ausgesetzt wurde. *Schute* nimmt an, daß die engen Kapillaren durch Kondensation gefüllt sind und daß das Elutionsmittel nur die breiteren, die Geschwindigkeit nicht aufhaltenden Kapillaren zu durchwandern braucht. Außerdem deutet auch die Tatsache, daß nach längerer Einwirkung der Dämpfe des Elutionsmittels vor dem Versuch auf dem Filtrierpapier die Front des Elutionsmittels nach der Elution viel schlechter als auf unbehandeltem Papier zu erkennen ist, nach *Schutes* Ansicht darauf hin, daß die verschwindenden Unterschiede in der Lichtbrechung des auf oder durch das Papier fallenden Lichtes auf eine Füllung des Papiers mit dem Elutionsmittel schon bei dessen Dampfeinwirkung zurückzuführen sind.



Es muß also angenommen werden, daß allgemein durch Einwirkung von Dämpfen des vorgesehenen Elutionsmittels die stationäre Phase als Volumenphase entweder im amorphen Zelluloseanteil oder durch Kapillarkondensation aufgebaut wird. Daher ist es verständlich, daß durch diese Vorbehandlung des Papiers eine Annäherung der Zusammensetzung der stationären und mobilen Phase eintreten wird, wodurch allgemein als Folge langer Vorbehandlung eine schlechtere Trennungsmöglichkeit der Untersuchungssubstanzen zu folgern ist, was für die Praxis von großer Wichtigkeit ist. Außerdem macht sich die Vorbehandlung auch in einer Veränderung des  $R_f$ -Wertes bemerkbar, eine Tatsache, die auch schon von anderen Autoren erwähnt wurde [55]. Als Beispiel sei hier eine Angabe von Schute [75] angeführt, daß bei Elution von Atropin mit 5%igem Ammoniak und Verwendung von lufttrockenem Papier ein  $R_f$ -Wert von 0,90 gefunden wurde, während dieser 0,56 bei 96stündiger Vorbehandlung betrug. Auch hieraus geht hervor, daß im praktischen Arbeiten der  $R_f$ -Wert keine Konstante sein kann.<sup>1</sup>

\*

Als Erkenntnis der aufgeführten Versuche folgert Schute, daß mit Ausnahme der Fälle, in denen eine Kapillarkondensation einer Flüssigkeit zum Aufbau der stationären Phase stattgefunden hat, eine Verteilung im Filtrierpapier nur erfolgt, wenn das Lösungsmittel in die amorphen Gebiete der Zellulose eindringen kann. Die entstandene Phase kann dabei auch eine mit der mobilen Phase sonst mischbare Flüssigkeit sein; es können sogar beide Phasen identisch sein (z. B. Wasser, in geringerem Maße Methanol). Der Verteilungsmechanismus tritt nur bei gut entwickelter Phase des amorphen Zellulosegebietes einwandfrei auf, sonst können sich anormale Flecke bilden, deren Entstehung auf Einschluß und Hysterese zurückzuführen sein kann und die durch Zusatz von Wasser zum Elutionsmittel zu verhindern sind. Die stationäre Phase wird meist nicht nur als wädrig-flüssige, sondern auch als eine Volumenphase anzusehen sein, gebildet aus Wasser und einem prozentual geringeren Anteil an dem als Elutionsmittel verwendeten Lösungsmittel.

\*

In diesem Zusammenhang sei auch die Veröffentlichung von Burma [13] erwähnt, in der ebenfalls die Verteilung der Phasen an der Zellulose sowie die Frage eingehend besprochen wird, wann mit Verteilungsvorgang oder Adsorption gerechnet werden müßte. Der Frage der Zusammensetzung der stationären Phase

<sup>1</sup> Auch L. Horner, W. Emrich und A. Kirschner (Z. Elektrochem. **56**, 987—995 [1952]) stellten in einer Anzahl von Experimenten den Einfluß der Vorbehandlung des Papiers im Sinne einer Erniedrigung der  $R_f$ -Werte sowie „die Verwischung der Unterschiede im  $R_f$ -Wert mit ansteigendem Wassergehalt“ des Elutionsmittels fest.

Die Abhängigkeit des  $R_f$ -Wertes vom Sättigungszustand des Papiers ging besonders aus den sich ändernden  $R_f$ -Werten von Leuzin hervor, das, mit Butanolwasser aufsteigend eluiert, den  $R_f$ -Wert 0,45 zeigte. Wurde jedoch in einem Streifen von doppelter Länge — verglichen mit der üblichen Streifenlänge — gearbeitet und die gleiche Leuzinmenge erst zu dem Zeitpunkt auf die gleiche Startstelle wie im ersten Versuch gebracht, als die Elutionsfront die halbe Höhe erreicht hatte, so ergab sich nach Weiterentwicklung bis fast zur ganzen Länge ein  $R_f$ -Wert von nur 0,33. Die Elutionsflüssigkeit hatte also bereits vor dem Aufsetzen des Leuzins im zweiten Versuch eine stärker wasserhaltige Zellulose-Wasser-Komplexphase aufgebaut, die zur Erniedrigung des  $R_f$ -Wertes führte.

versucht *Burma* mit Hilfe der von *Consden, Gordon und Martin* [18] aufgestellten Formel

$$\alpha = \frac{A_L}{A_S} \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

näherzukommen. Er geht in einer Versuchsreihe zunächst fast den gleichen Weg wie *Consden, Gordon und Martin* [18], indem er die  $R_f$ -Werte der einzelnen Aminosäuren und Zucker aus gemessenen  $\alpha$ -Werten und aus dem für diese Reihe zunächst als konstant angenommenen — willkürlich aus  $\alpha$ - und  $R_f$ -Wert von Alanin

bestimmten — Wert für  $\frac{A_L}{A_S}$  berechnet. Bei diesem Vorgehen treten Abweichungen

der berechneten  $R_f$ -Werte der einzelnen Substanzen gegenüber den gemessenen auf. Wird aber das Verfahren umgekehrt, d. h., werden die experimentell gemessenen  $R_f$ - und  $\alpha$ -Werte in die genannte Gleichung eingesetzt, so werden

Werte für  $\frac{A_L}{A_S}$  erhalten, die bei den einzelnen Untersuchungssubstanzen sich etwas

von dem ursprünglichen, für Alanin experimentell bestimmten unterscheiden

(s. dazu Tabelle 5 und 6 im Original). In dieser Veränderung von  $\frac{A_L}{A_S}$  und damit von

$A_S$  — wegen der erheblich größeren Menge des Elutionsmittels gegenüber der stationären Phase wird die Zusammensetzung von  $A_L$  nur wenig schwanken — sieht der Verfasser eine indirekte Bestätigung einer Assoziation der gelösten Molekeln mit der Zellulose des Filtrierpapiers, wie sie auch von anderen Beispielen her bekannt sei, z. B. von der verringerten Lösungsfähigkeit des Wassers in gequollener Zellulose. Die Lösungsfähigkeit gegenüber Aminosäuren in wässriger Lösung prüfte der Verfasser in einer Reihe von Versuchen, indem er bekannte Gewichtsmengen von Filtrierpapier mit wässrigen Aminosäurelösungen bekannten Gehaltes bis zur Gleichgewichtseinstellung zusammenbrachte. Dabei stellte er interessanterweise fest, daß die Menge an nichtlösendem Wasser für Zellulose nicht konstant bleibt, sondern daß vielmehr das Volumen des sogenannten nichtlösenden Wassers — nach der Quellung — mit steigender Konzentration der Aminosäuren fällt. Ebenso tritt eine Veränderung des Gehaltes an nichtlösendem Wasser von einer Aminosäure zur anderen ein.

Aus diesen experimentellen Ergebnissen entwickelt der Verfasser seine Vorstellung von dem Mechanismus während des Verlaufes der Papierchromatographie. Er weist zunächst darauf hin, daß in lufttrockener Zellulose 5,9% als fest gebundenes (Hydrat-) Wasser vorliegen, die er dem nicht lösenden Anteil gleichsetzt. Bei einem normalen Gesamtwassergehalt von 22% in gesättigter Zellulose käme daher als löslicher Anteil:  $(22-5,9)\% = 16,1\%$  in Frage, d. h. 73% des in der Zellulose enthaltenen Gesamtwassers. Da in der Volumeneinheit zwar in der mobilen Phase das gesamte Wasser, in der stationären Phase aber nur 73% davon zur Lösung instande sind, müßte bei Anwendung von Wasser als Elutionsmittel der Vertei-

lungskoeffizient für alle gelösten Substanzen 0,73 sein, wie *Burma* angibt. Hieraus folgt wieder auf Grund der Formel von *Consden, Gordon und Martin* [18]

$$\alpha = \frac{A_L}{A_S} \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

die Gleichheit der  $R_f$ -Werte aller gelösten Substanzen mit Wasser als Elutionsmittel, was aber in der Praxis nicht zutrifft (s. die erwähnten Versuche von *Moore und Stein* [57], die z. B. bei Tryptophan eine Abweichung gefunden haben [ $R_f = 0,57$ ]). Ebenso wie diese Autoren folgert auch *Burma* aus der, wenn auch häufig nur geringen Verschiedenheit der  $R_f$ -Werte bei Wasser als Elutionsmittel das, oft sicherlich nur geringe, Auftreten von Adsorption als Nebenerscheinung und entwickelt Anschauungen über den allgemeinen Mechanismus der Papierchromatographie, die in vielen Punkten denen von *Hanes und Isherwood* [32] ähneln. Die Bindung von Wassermolekeln an Zellulose ist infolge von Wasserstoffbrückenbindung sicherlich erheblich stärker als eine analoge mit z. B. Methanolkolekeln. Die gelösten Substanzmolekeln werden daher bei der Konkurrenz um eine Annäherung und Bindung an die Zellulose dieses eher bei Methanol (oder anderen Alkoholen, falls überhaupt Wanderung eintritt) als bei Wasser erreichen. Die vom Verfasser mit absolutem Methanol durchgeführten Versuche, wobei Streifenbildung auftritt, weisen auf die Richtigkeit dieser Überlegung, hin.

Interessante Ausführungen macht der Verfasser noch über die Zusammensetzung der verteilenden Phasen auf Grund der Verteilungsversuche von Aminosäuren mit Äthanol verschiedenen Wassergehaltes. Bei Annahme einer wäßrigen und einer mit Wasser verdünnten Äthanolphase liegen die Werte für  $\frac{A_L}{A_S}$  auf

Grund der früher gemessenen  $\alpha$ -Werte im normalen Bereich. Dieses ist jedoch bei stärkerem Steigen des Äthanolgehaltes — wiederum auf Grund der früher in besonderen Versuchsreihen gemessenen  $\alpha$ -Werte — nicht mehr der Fall ( $\frac{A_L}{A_S}$  bis 92).

Die diesen Berechnungen zugrunde liegenden anormal hohen  $\alpha$ -Werte (bis 519) werden nach Meinung von *Burma* in Wirklichkeit im Chromatogramm nicht in Erscheinung treten. Es ist vielmehr — unter Heranziehung der oben erwähnten Gedankengänge von *Burma* — anzunehmen, daß auch hier eine Konkurrenz der Hydroxylgruppen in Äthanol und in Wasser um die Wasserstoffbrückenbildungsmöglichkeit zur Zellulose einsetzt und daher die stationäre Phase in diesen Fällen nicht aus Wasser und Zellulose allein besteht — wie bei der Bestimmung der  $\alpha$ -Werte —, sondern zu den beiden noch Äthanol tritt, wodurch veränderte Löslichkeitsbedingungen für die zu verteilenden Substanzen, z. B. die Aminosäuren, sich ergeben. Dieser äthanolarmen Zellulose-Wasserphase steht dann die wasserarme Äthanolphase gegenüber. Unter diesen Bedingungen sind wieder normale  $\alpha$ -Werte

sowie solche für  $\frac{A_L}{A_S}$  anzunehmen.



Da bei allen diesen Vorgängen auch die Konkurrenz der gelösten Substanzen mitwirken kann, wie es die zuerst geschilderten Versuche von *Burma* schließen lassen, ist es verständlich, daß der Verfasser für die Ansicht eintritt, daß die gelöste Substanz das Verhältnis  $\frac{A_L}{A_S}$  beeinflussen kann.<sup>1</sup>

Abschließend stellt der Verfasser fest, daß auf Grund seiner Versuche der Verteilungsmechanismus auf breiter Basis wirksam ist, da bei Annahme der Adsorption als primärem Mechanismus die  $R_f$ -Werte durch wechselnde Konzentration der Untersuchungssubstanzen stärker beeinflußt werden müßten. Starke Adsorption muß aber z. B. bei der Chromatographie mit absolutem Methanol angenommen werden (s. dazu auch die Ausführungen von *Schute*!). Trotz der Möglichkeit (bei Annahme getrennter Phasen), gewisse Berechnungen (z. B. des  $R_f$ -Wertes usw.) durchzuführen, besteht nach *Burmas* Auffassung kein Grund zur Annahme, daß diese Phasen scharf voneinander getrennt sind. Dabei besteht die stationäre Phase nicht nur aus einem Zellulose-Wasser-, sondern einem Zellulose-Wasser-nichtwäßrigen Flüssigkeits-Komplex. Bei der Wanderung der mobilen Phase auf dem Filtrierpapier tritt wegen der großen Affinität der Zellulose zu Wasser allmählich eine Wasserverarmung der mobilen Phase ein, weshalb sich die Verteilungsverhältnisse ständig während der Wanderung auf dem Papier ändern sollen. Die Verteilung zwischen dem lose gebundenen Wasser des Zellulose-Wasser-Komplexes und der nichtwäßrigen Flüssigkeit wird vom Verfasser als reiner Verteilungsvorgang bezeichnet, während die Verteilung zwischen dem fest und dem locker gebundenen Wasser in der Zellulose als Adsorptionsprozeß gedeutet wird. Der erstgenannte Prozeß soll für die eigentliche Trennung von Substanzen verantwortlich sein, während der letztgenannte von sekundärer Bedeutung ist, aber nicht übersehen werden darf, da er in manchen Fällen die Hauptrolle spielen kann, wobei der Verfasser auf eigene Beobachtungen verweist [14]. (Vergleiche dazu die ähnlichen Vorstellungen von *Erbring* [25] über das Adsorptions- und Verteilungsgewicht).

\*

Aus diesen Ausführungen von *Burma*, aber auch aus denen anderer Autoren geht hervor, daß neben der Verteilung auch eine Adsorption im Verlauf der Papierchromatographie anzunehmen ist. In einem besonderen Kapitel trat *Schute* [69] diesem Problem theoretisch und experimentell näher. Er stellte zunächst fest, daß im Bereich von kleineren Konzentrationen, wie sie bei der Papierchromatographie vorliegen, die Anwendung der Adsorptionsisothermformel nach *Langmuir* zu einer

<sup>1</sup> Daß der Gehalt an gelösten Verbindungen beim Eluieren einen Einfluß auf den Aufbau des Zellulose-Wasser-Komplexes hat, konnten auch *L. Horner*, *W. Emrich* und *A. Kirschner* (*Z. Elektrochem.* **56**, 987—995 [1952]) in sehr interessanten Versuchen refraktometrisch am ablaufenden Elutionsmittel nachweisen, wobei sie als Testsubstanzen Aminosäuren bzw. Kaliumjodid verwendeten. Zum Verständnis der Mitwirkung dieser gelösten Substanzen wiesen die Verfasser auf die erhebliche Solvation der Substratmolekeln hin. Jedoch fand diese verstärkte Bindung von Wasser nur bei 81- bzw. 90%igem Butanol statt, nicht aber bei der inversen Butanol-Wasserphase. Analoges fand sich bei Verwendung von Phenol-Wassergemischen verschiedener Konzentration.

Weiterhin wiesen die Verfasser nach, daß die vom Papier aufgenommene Wassermenge in erheblichem Maße von der Menge der gelösten Substanzen abhängt, wozu auch quantitative Angaben gemacht wurden.

Linearen führen kann, was mit der *Freundlich*-Isotherme niemals der Fall ist. Daraus ergibt sich, daß die Anwendung der *Langmuir*-Isotherme auf papierchromatographische Vorgänge ebenso wie der normale Verteilungsvorgang normale Chromatogramme liefern kann, während die nichtlineare Adsorptionsisotherme nach *Freundlich* zu Bildern führen muß, wie sie bei einem anormalen, konzentrationsabhängigen und streifenbildenden Chromatogramm auftreten. Auf Grund der *Freundlich*-Isotherme werden sich im Papierchromatogramm Gebiete geringerer Konzentration langsamer als die höherer Konzentration bewegen, d. h. auf einen Fleck bezogen wird dessen Mitte (stärkere Konzentration) schneller wandern als dessen Randpartie (schwächere Konzentration infolge Diffusion). Daher wird ein kometartiges Aussehen im Chromatogramm mit einer spitzzulaufenden, intensiv nachzuweisenden Vorderfläche und einem undeutlich verlaufenden Schwanz zu erwarten sein, und solche Bilder sind in der Praxis tatsächlich bekannt. Jedoch wird man in allen Fällen den einzelnen Vorgang genau prüfen müssen, ob nicht noch weitere Möglichkeiten für die Schwanzbildung in Frage kommen, wie sie später noch besprochen werden. Experimentell ist *Schute* so vorgegangen, daß er den papierchromatographischen Vorgang unter Ausschluß aller Möglichkeiten des Auftretens von Verteilungsvorgängen, die er auf Grund seiner früheren Versuche festgelegt hatte, durchführte (Chloroform als Lösungsmittel für die Untersuchungssubstanz [Atropin], da Chloroform nicht in amorphe Regionen des über CaO getrockneten Filtrierpapiers eindringt; das gleiche gilt von Hexan, das als Elutionsmittel verwendet wurde). Unter derartigen Bedingungen — in allen Fällen fehlte die Gegenwart auch von Spuren Wasser — wurde kein normales Chromatogramm (runder Fleck), sondern ein langgestreckter Atropinstreifen erhalten, der so zu deuten war, daß aus dem kompakten Atropinfleck an der Elutionsfront laufend etwas Atropin an das Papier abgegeben wurde und infolge der irreversiblen Bindung des Atropins an das Papier weiteres Elutionsmittel (Hexan) das adsorbierte Atropin nicht mehr fortbewegen konnte.

Ein ähnliches Bild wurde gewonnen, wenn Papier angewandt wurde, das vor der Elution in einer Atmosphäre von 60% r. D. (über gesättigter Natriumbromidlösung) längere Zeit aufbewahrt wurde. Wurde jedoch Papier verwendet, das längere Zeit vor der Elution in einer Atmosphäre von 75% r. D. (über gesättigter Kochsalzlösung) gewesen war, so zeigte sich schon der Beginn einer Verteilung und das Auftreten einer nicht mehr irreversiblen Adsorption. Das Wasser des Wasserdampfes über der gesättigten Kochsalzlösung begann, eine stationäre Phase aufzubauen, so daß ein Verteilungsvorgang einsetzen konnte. Daß das gleiche nicht bei der Verwendung von gesättigter Natriumbromidlösung auftrat, kann durch die Annahme der alleinigen Hydratbildung in der Zellulose erklärt werden, so daß die Voraussetzungen für den Verteilungsvorgang noch nicht gegeben waren. (Die Hydratbildung allein führt daher wohl noch nicht zu einem ordnungsmäßigen Verteilungsvorgang.) Die sehr interessanten Einzelheiten bei der Durchführung dieser Versuche müssen im Original nachgelesen werden.

Es sei hier nur noch ein Versuch angeführt, bei dem nicht ein, sondern zwei Alkaloide (Atropin und Apoatropin) unter den zuerst genannten Bedingungen geprüft wurden. Das Atropin lag dabei auf der gleichen Fläche wie im ersten Versuch, das Apoatropin darüber, während bei Fortlassen des Atropins in einem weiteren Einzelversuch Apoatropin etwa an der gleichen Stelle wie Atropin liegt. Daraus ist auf die größere Affinität von Atropin zum Papier zu schließen, die vielleicht auf den Besitz einer Hydroxylgruppe bei Atropin, im Gegensatz zu Apoatropin, zurückzuführen ist, die mit Zellulose Wasserstoffbrückenbindung eingeht. Das Verdrängtwerden des Apoatropins durch Atropin deutet auch auf das Vorliegen von Adsorption, da durch Verteilungsvorgänge solche Erscheinungen nicht zu deuten sind.

*Schute* führte, um Einwänden entgegenzutreten, die Ergebnisse seien vielleicht auf eine Ionenbildung des Atropins zurückzuführen — worüber später allgemein berichtet wird —, analoge Versuche mit nichtdissoziierenden Substanzen (Antipyrin, Pyramidon) durch, wobei er die gleichen Ergebnisse hinsichtlich des chromatographischen Bildes sowie gegenseitiger Verdrängung erhielt.

Mit diesen Versuchen sind die Bedingungen festgelegt, unter denen Adsorptionserscheinungen auftreten. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß anormale Chromatogramme auch unter Bedingungen erhalten werden können, unter denen eigentlich normale Verteilungschromatogramme resultieren müßten. Für das Auftreten anormaler Chromatogramme können dann nach *Schute* besonders 2 Faktoren verantwortlich sein:

- a) Konzentrationsabhängigkeit infolge der Ionenbildung der gelösten Substanz,
- b) Auftreten von Ionenaustausch am Papier.

Über beide Erscheinungen sei im folgenden eingehender berichtet. Der Einfluß der Ionenbildung ist schon sehr bald nach dem Aufkommen der Papierchromatographie als erschwerend für das Erhalten normaler, brauchbarer Chromatogramme festgestellt worden, weil er häufig zu störenden Schwanzbildungen („Kometbildung“ im angelsächsischen Schrifttum) auf dem Chromatogramm führte. Solche Chromatogramme entstehen bei vielen gelösten Substanzen in saurer, basischer oder salzartiger Form und wurden besonders bei der Papierchromatographie der organischen Säuren und Basen (hier vor allem der Alkaloide) beobachtet. Als erste trafen wohl *Lugg* und *Overell* [47] mit dieser Frage bei der papierchromatographischen Untersuchung von Mischungen organischer Säuren zusammen. In einer späteren Arbeit [48] stellen diese Autoren, ähnlich wie *Martin* und *Synge* [53] sowie *Consden*, *Gordon* und *Martin* [18], fest, daß für die Papierchromatographie der organischen Säuren die üblichen allgemeinen Forderungen erfüllt sein müssen:

1. Günstige Löslichkeit der Untersuchungssubstanz in beiden Phasen,
2. Fortfall von Adsorptionserscheinungen,
3. Konstanz



- a) des Verteilungskoeffizienten der Untersuchungssubstanz innerhalb der verwendeten Konzentrationsgebiete,
- b) der Phasenzusammensetzung, auch bei Zusatz von Säure,
- c) des Mengenverhältnisses zwischen stationärer und mobiler Phase während des ganzen Ablaufes der Chromatographie.

Die Verfasser glauben, daß bei organischen Säuren mit abnehmender Konzentration eine Änderung der Verteilungskoeffizienten zugunsten der wäßrigen (stationären) Phase eintritt, was durch die Überlegung verständlich wird, daß allgemein durch Verdünnen einer Lösung der prozentuale Anteil der im Vergleich zur undissoziierten Verbindung stärker hydrophilen Ionen steigt. Andererseits kann durch Zusatz eines Überschusses einer stärkeren Säure die zur Untersuchung gelangende Säure in überwiegender Masse in die gleichartige Zustandsform als nichtdissoziierte Molekel gebracht und die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten — und dadurch auch des  $R_f$ -Wertes — von der Änderung der Konzentration während der Chromatographie beseitigt werden. Bei der Chromatographie von organischen Säuren, wie auch sonstiger dissoziierender Substanzen, ist also zu beachten (worauf *Benson* und Mitarbeiter [4] anlässlich der papierchromatographischen Identifizierung der bei der Assimilation in Gegenwart von radioaktivem Kohlenstoff entstehenden Säurezwischenprodukte auch hinweisen), daß deren Verteilung sowohl von dem Verteilungskoeffizienten der undissoziierten Säure als auch dem Dissoziationsgrad der Säure und dieser wieder vom  $p_H$ -Wert der wäßrigen Phase abhängt. Die Verteilung dissoziierender Substanzen (und damit der  $R_f$ -Wert z. B. einer organischen Säure) ist also eine Funktion von 2 physikalischen Größen (Verteilungskoeffizient und Dissoziationskonstante) und einer experimentellen Bedingung, dem  $p_H$ -Wert der wäßrigen Phase des Chromatogramms.

Der Ablauf der papierchromatographischen Wanderung von Karbonsäuren oder allgemeiner von dissoziierenden Verbindungen ist also nach diesen Autoren [4] wie folgt vorzustellen: Bei Verwendung von neutralen, nicht gepufferten Elutionsmitteln hängt der  $p_H$ -Wert der wäßrigen Phase an einem gegebenen Punkt nur von der Konzentration der Karbonsäure an diesem Punkt ab. Wenn die mobile Phase die Säure über diesen Punkt hinausbefördert, treten infolge der zunächst einsetzenden Verteilung ein Abfall der Konzentration und ein Steigen des Dissoziationsgrades ein, womit eine sich verändernde Verteilung der Säure zwischen den Phasen einhergeht. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Säure fällt mit sinkender Konzentration, wobei Streifenbildung eintritt. Die Verhinderung dieser Streifenbildung kann durch Zugabe einer Säure oder einer Pufferlösung zum Elutionsmittel oder zur wäßrigen Phase geschehen. Die allgemeine Forderung zur Verhinderung von Streifen- oder „Komet“-Bildung formulierten *Lugg* und *Overell* [48], indem sie entweder die Verwendung von zwei nichtdissoziierenden und teilweise miteinander mischbaren Flüssigkeiten zur Verteilung (von denen die eine stationär auf einem geeigneten Träger bleiben müßte) oder aber die Unterdrückung der Dissoziation in dem die Dissoziation begünstigenden Elutions-

mitteln durch geeigneten (z. B. Säure-)Zusatz forderten. In der Praxis läßt sich nur die zweite Forderung verwirklichen. Wird dabei eine Säure verwendet, so wird man zweckmäßigerweise eine flüchtige nehmen, da der Nachweis der organischen Säuren — wegen des Fehlens spezifischer Reagenzien — meist mit Säureindikatoren, z. B. Bromphenolblau- oder Bromkresolgrünlösungen besonderer Zusammensetzung, also eigentlich nur des H-Ions, erfolgt.

Allgemein stellen *Lugg* und *Overell* fest, daß bei dissoziierenden Verbindungen eine Erhöhung des Verteilungskoeffizienten zugunsten der mobilen Phase einen „Kometen“ hervorbringen kann, dessen Kopf in Richtung der Front des Elutionsmittels liegt, im umgekehrten Fall würde die Erhöhung zugunsten der stationären Phase stattgefunden haben. Keine dieser Erscheinungen ist bei der Bearbeitung der Aminosäuren oder Zucker aufgetreten. Die Verfasser erklären dieses mit dem Hinweis darauf, daß die Zucker nicht merklich dissoziiert sind und daß sich Aminosäuren, obwohl sie auf Grund der „Zwitterionentheorie“ bei ungefährer Neutralität (hinsichtlich der  $\alpha$ -Amino- oder Imino- und der Karboxylgruppe) eigentlich vollkommen dissoziiert sind, fast ausschließlich durch innere Kompensation — wie *Jermstad* und *Jensen* [38] es bezeichnen — in einer einzigen Form innerhalb des Bereiches sehr hoher bis zu sehr geringen Konzentrationen und über einen ziemlich weiten  $p_H$ -Bereich befinden.

Bei Monoamino-Dikarbonsäuren und basischen Aminosäuren ist eine gewisse Schwierigkeit bei geringen Konzentrationen vorauszusehen. Für solche Aminosäuren wurde in schwach alkalischem oder saurem Bereich tatsächlich eine Veränderung der  $R_f$ -Werte, jedoch kein „Komet“-Effekt von *Consden*, *Gordon* und *Martin* (18) angegeben.

*Lugg* und *Overell* glauben, daß durch den Zusatz einer flüchtigen (z. B. Ameisen- oder Essig-) Säure, wodurch eine Verringerung oder Unterdrückung der Dissoziation der Untersuchungssäure eintritt, deren Neigung, adsorbiert zu werden, erhöht wird. Wenn die Adsorption dennoch nicht zustande kommt, so liegt dieses an der — im Verhältnis zur Untersuchungssäure — hohen Konzentration der zugesetzten flüchtigen Säure, die daher noch stärker adsorbiert wird und eine Adsorption der Untersuchungssäure nicht zuläßt. Dieser Ansicht kann *Schute* [69] nicht beipflichten, sondern glaubt, daß es sich um Ionenaustausch handelt, indem das Wasserstoffion der Säure an die Stelle des Kations tritt, das bisher in irgendeiner Form an der Zellulose gehalten wurde. Es ist daher verständlich, daß der  $p_H$ -Wert der Lösung, mit der die Zellulose behandelt wurde, steigen muß (die Lösung wird weniger sauer), wie *Lugg* und *Overell* angeben, da sie durch die Abgabe von Wasserstoffionen an die Zellulose einen Teil der bisher gehaltenen verliert. Die Konzentration an Anionen in der Säurelösung muß aber auch nach der Behandlung der Zellulose (bzw. des Filtrierpapiers) die gleiche geblieben sein, wenn nicht eine weitere, hier nicht diskutierte Reaktion sie in irgendeiner Weise festgelegt hat.

In diesem Zusammenhang sei noch auf die Befunde von *Aronoff* [2] bei der papierchromatographischen Untersuchung von Lysin hingewiesen, der je nach  $p_H$ -Wert (2,20—12,15) der aufgesetzten Lösung (Elutionsmittel: wassergesättigtes

Phenol) sehr verschiedene chromatographische Bilder erhielt. Stark saure Lysin-Ausgangslösung brachte nur einen einzigen Fleck, stark alkalische Ausgangslösung jedoch deutlich zwei Flecke, obwohl es sich um mehrfach gereinigtes Lysin handelte (s. Photo im Original). Zwischen diesen beiden extremen Fällen lagen je nach dem  $p_H$ -Wert der Ausgangslösung Übergänge. Zur Erklärung der Befunde weist der Verfasser auf die verschiedenen Ionenarten von Lysin je nach dem  $p_H$ -Wert hin und gibt sogar die  $R_f$ -Werte der einzelnen Ionenarten an. Immerhin erscheint der Befund überraschend, da bei einem Verteilungsvorgang in der wäßrigen Phase sich immer wieder ein Gleichgewicht einstellen sollte, wenn der Fleck wandert.

Schließlich sei allgemein noch darauf hingewiesen, daß auch trotz Säurezusatzes zum Elutionsmittel Schwanzbildung bei der Papierchromatographie organischer Säuren auftreten kann, wenn nämlich die Konzentration der untersuchten Säuren so hoch ist, daß die Löslichkeit in der Elutionsphase überschritten ist. Durch die einsetzende Streifenbildung kann auch Adsorption vorgetäuscht werden, obwohl diese auf Grund der *Schuteschen* Versuche [69] unter diesen Umständen gar nicht eintreten kann. Die von *Jermstad* und *Jensen* [38] untersuchten Säuren zeigten bei zunehmenden Konzentrationen sehr verschiedene Neigung zur Schwanzbildung: Wein-, Zitronen- und besonders Oxalsäure gaben nur sehr schwer gut definierte Flecke, für Oxalsäure war in gewissen Elutionsmischungen kein  $R_f$ -Wert anzugeben. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, daß nicht immer die Säuren mit dem niedrigsten  $p_{K_1}$ -Wert, sondern diejenigen, die in der  $R_f$ -Reihe am niedrigsten standen, zuerst Schwanzbildung zeigten, d. h. also, bei denen die Affinität zur wäßrigen Phase am größten war (s. Oxalsäure). Auf die praktische Arbeit der Papierchromatographie betreffenden interessanten Einzeltatsachen (z. B. Labilität gewisser Flüssigkeitsgemische als Elutionsmittel) der Arbeiten von *Jermstad* und *Jensen* [38] sowie von *Lugg* und *Overell* [48] sei hier nur verwiesen.

Auch bei der Papierchromatographie der Alkaloide sind analoge Schwanzbildungen beschrieben worden, insbesondere von *Munier* und *Macheboeuf* [58, 59, 60]. Hierüber ist von uns [9] an anderer Stelle berichtet worden. Es sei nur darauf hingewiesen, daß die Verfasser in ihren Arbeiten einen Zusammenhang zwischen normalem Chromatogramm, Dissoziationskonstante des untersuchten Alkaloids und Menge sowie Art der zuzusetzenden Säure feststellten bzw. sich in praktischen Arbeiten darauf einstellten. Während bei den praktisch vollständig dissoziierten Alkaloiden (z. B. vom Typ der quartären Ammoniumverbindungen) und bei den praktisch gar nicht dissoziierten organischen Stickstoffverbindungen (z. B. Xanthinderivate) keine Streifenbildung eintritt, ist dieses bei denjenigen Alkaloiden der Fall, deren Dissoziationskonstante zwischen denen der beiden eben genannten Gruppen liegt, da von ihnen sowohl die dissoziierte als auch die undissoziierte Form existiert. Durch Säurezusatz kann diesem bei einem Teil der Alkaloide begegnet werden.



*Schute* [75] ist den bei der Elution eines Alkaloidsalzes sich abspielenden Vorgängen nachgegangen, das in der stationären wäßrigen Phase dissoziiert, nicht dagegen in der organischen. In der stationären Phase besteht, wie *Schute* ausführt, das Gleichgewicht  $B + H_2O \rightleftharpoons BH^+ + OH^-$  ( $B$  = Alkaloidbase) mit der Dissoziationskonstanten:

$$K_B = \frac{C_{BH} \cdot C_{OH}}{C_B} \quad (C_{BH} \text{ u. } C_{OH} = \text{Konzentrationen der Ionen}).$$

Ist die Gesamtkonzentration in der stationären Phase gleich  $C_S$ , ( $C_S = C_B + C_{BH}$ ), so folgt durch Substitution von  $C_{BH}$  für  $K_B$ :

$$C_S = C_B \left( 1 + \frac{K_B}{C_{OH}} \right) \text{ oder } \frac{C_S}{C_L} = \left( 1 + \frac{K_B}{C_{OH}} \right) \cdot \frac{C_B}{C_L}$$

( $C_L$  = Konzentration in der mobilen Phase).

Bei  $\frac{C_B}{C_L}$  nimmt *Schute* Unabhängigkeit von der Konzentration an, so daß sich aus der Gleichung das Fallen des Verteilungskoeffizienten  $\frac{C_S}{C_L}$  mit steigendem Wert für  $C_{OH}$  und umgekehrt ergibt. Durch Zusatz einer Base, z.B. Ammoniak, wird in der angegebenen Gleichung  $C_{OH}$  sehr groß, daher  $\frac{C_S}{C_L}$  klein, d. h. der Verteilungskoeffizient für die mobile Phase meist so günstig, daß die Alkaloide mit der Elutionsmittelfront mitwandern und der  $R_f$ -Wert meist fast gleich 1 ist, weshalb dadurch keine Trennungen zustande kommen (Ausnahmen: quartäre Ammoniumverbindungen, Xanthinderivate). In der Praxis arbeitet man daher in der Mehrzahl der Fälle mit einem bestimmten mengenmäßigen Zusatz von Säure (Mineral- oder organische Säure). Gut scheint uns auch, den Ausdruck  $C_S = C_B + C_{BH}$  durch  $C_L$  zu dividieren, wodurch erhalten wird:

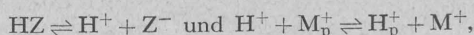
$$\frac{C_S}{C_L} = \frac{C_B}{C_L} + \frac{C_{BH}}{C_L} = \frac{C_B}{C_L} \cdot \left( 1 + \frac{C_{BH}}{C_B} \right).$$

Hieraus ergibt sich das Steigen des Verteilungskoeffizienten zugunsten der wäßrigen Phase durch Steigen der Alkaloidionen- oder Fallen der Gesamtalkaloidkonzentration. Bei kleinen Alkaloidkonzentrationen besteht daher ein für die wäßrige (stationäre) Phase günstigeres Verhältnis, was sich in einem geringeren  $R_f$ -Wert ausdrücken muß. Die Randgebiete eines solchen Alkaloidfleckes stellen gegenüber dem Zentrum Gebiete von geringerer Konzentration dar, die langsamer wandern als das Zentrum. Das Resultat muß also eine Streifenbildung des Fleckes sein.

\*

Wie bereits erwähnt, kann auch Ionenaustausch auf dem Papier eine wichtige Rolle in der Papierchromatographie spielen. Ein solcher Ionenaustausch ist schon lange bekannt und um so stärker, je höher der Aschegehalt (besonders Kalziumsilikat) des Papiers ist. Ebenso spielen aber die Karboxylgruppen eine Rolle, die bei der Aufarbeitung des Zellulose durch Oxydation einiger Hydroxylgruppen entstehen können. *Broda* und *Schönfeld* [12, 68] verwendeten radioaktive Indikatoren und wiesen nach, daß Karboxylgruppen der Zellulose für den Ionenaustausch verantwortlich sein können (etwa  $5 \times 10^{-5}$  Äquivalent je Gramm). *Schönfeld* und *Reinhartz* [67] wiesen darauf hin, daß es durch Behandlung mit Salzlösungen möglich sei, die an die Karboxylgruppen gebundenen Kationen durch andere Kationen zu ersetzen, wobei das Wasserstoffion eine besondere Stellung einnimmt; denn dieses wird infolge der Bildung der schwach dissoziierten Kohlensäure hauptsächlich kovalent gebunden, während die Bindung der sonstigen Ionen elektrostatisch erfolgt. Die Haftfestigkeit des Wasserstoffions ist daher erheblich größer als die mehrwertiger Ionen. Bei Anordnung der Ionen nach der Stärke ihrer Adsorption am Papier wird eine Reihe erhalten, die mit der analogen Reihe für karboxylgruppenaktive Kunstharzaustauscher mit großen Kapazitäten gut übereinstimmt, wie *Schönfeld* und *Reinhartz* bemerken.

*Schute* [69, 74] führte seine Versuche über den Ionenaustausch mit Hilfe von organischen Säuren (als Anionenprüfung) und Alkaloiden (als Kationenprüfung) auf lufttrockenem Papier in aufsteigender Methode durch. Als Säure verwendete er besonders Salizylsäure, deren Kation (mit Methylrotlösung) wie Anion (mit alkoholischer Eisen(3)chloridlösung) sich einfach nachweisen läßt. Bei der Elution mit Wasser können nach *Schute* folgende Reaktionen auftreten:



wobei  $\text{M}_p^+$  ein an das Papier gebundenes Metallion und  $\text{H}_p^+$  das Wasserstoffion darstellt, das im Papier an Stelle des  $\text{M}_p^+$  getreten ist.

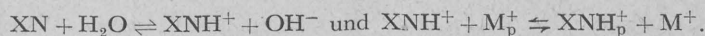
*Schute* beobachtete bei der papierchromatographischen Untersuchung der Salizylsäure ein getrenntes Wandern von Anion und Kation, eine Tatsache, die auch von anderen Autoren berichtet wurde. Das H-Ion war zurückgeblieben und bedeckte eine Fläche, die sich auch genau berechnen ließ (in seinem Versuch 0,55 Milliäquivalent/ $\text{m}^2$  Papier), während das Salizylation sich fast an der Frontlinie des Elutionsmittels nachweisen ließ. Das Zurückbleiben des H-Ions konnte nur durch Austausch mit einer Substanz aus dem Papier erklärt werden, die das Salizylation elektrisch kompensierte, wobei an Metallionen (z. B. Ca-Ionen) zu denken war. Das dadurch entstandene salizylsaure Salz wanderte an der Frontlinie des gut lösenden Elutionsmittels (Wasser). Der bereits genannte Wert von 0,55-m-Äquivalent/ $\text{m}^2$  Papier stellte also die austauschbare Ionenmenge in *Schutes* Versuchen dar.

Zur Klärung des Einflusses von Elektrolyten auf den Ionenaustausch führte *Schute* analoge Versuche mit  $\frac{n}{10}$  Kochsalz-, Kaliumchlorid bzw. Magnesiumsulfat aus, wobei er die gleichen Resultate wie mit reinem Wasser erhielt. Durch Elution

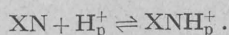
mit Magnesium- oder Kalziumazetatlösung wanderten aber runde Säureflecke kurz hinter der Flüssigkeitsfront, dichter sogar als die Salzflecke. Zur Erklärung dieser Erscheinung nimmt *Schute* eine Abpufferung der Wasserstoffionen durch die Überzahl an Azetationen an.

Interessant sind weiterhin die experimentellen Befunde von *Schute*, daß ein Teil der austauschbaren Ionen auf dem Papier bereits durch Behandlung mit Wasser, d. h. durch Austausch gegen die auch in reinem Wasser enthaltenen Wasserstoffionen, entfernt werden können, wobei aber auch ein konstanter Endwert erreicht wird (0,37 gegenüber 0,55-m-Äquivalente/m<sup>2</sup>).

Analoge Austauschreaktionen wie bei den organischen Säuren können auch bei Alkaloiden eintreten, wobei *Schute* folgende Formulierungen einführt:



Ist das Papier, etwa durch vorherige Behandlung mit Säure, mit Wasserstoffionen bereits besetzt, so ist direkte Salzbildung auf dem Papier nach folgendem Schema möglich:



Zur Nachprüfung der Verhältnisse der letzten Gleichung wurde mit Säure — wie oben — behandeltes Filtrierpapier, auf das ein Atropinfleck gesetzt wurde, mit Wasser eluiert. Die mit Jod nachgewiesene Atropinfläche ließ einen Wert von 0,50 Milliäquivalent an auswechselbaren Ionen auf dem Papier berechnen, der recht gut mit dem früher berechneten übereinstimmte. Es waren durch die Säurebehandlung also auf dem Papier zunächst alle ionenaustauschenden Stellen durch H-Ionen besetzt worden, die den wandernden Atropinfleck, soweit sie von ihm berührt wurden, auf dem Papier als mit *Dragendorffs* Reagens nachzuweisende Fläche festlegten.

Das so an die Wasserstoffionen auf dem Papier gebundene Atropin war durch Elution mit Wasser nicht, wohl aber durch Elution mit einer Salzlösung, z. B. 0,2 *n* Kaliumchloridlösung, wieder zu entfernen; es trat als eine Verdrängung des Alkaloidions durch das mengenmäßig überlegene Kaliumion ein. Ähnliche Verdrängungen treten auch bei den Alkaloiden untereinander auf, wodurch deren Trennung möglich ist. Als Beispiel führt *Schute* die Trennung von Belladonnin, Apotatropin, Atropin und Skopolamin unter den geschilderten Bedingungen durch Elution mit Wasser an.<sup>1</sup>

\*

<sup>1</sup> L. Horner, W. Enrich und A. Kirschner (Z. Elektrochem. **56**, 987—995 [1952]) ließen zur Methylierung der Karboxylgruppen mehrere Stunden lang eine Lösung von Diazomethan in Äther-Methanol auf Filtrierpapier einwirken, konnten aber nach der Entwicklung mit wäbrigem Butanol keine Veränderung der *R<sub>F</sub>*-Werte feststellen, obwohl die Anzahl der Methoxylgruppen in der Zellulose prozentual sich vergrößert hatte. Sie schlossen daraus: „Säure Gruppen sind demnach in den üblichen, für papierchromatographische Zwecke empfohlenen Sorten nicht wesentlich im Sinne einer Austauschadsorption beteiligt. Die Untersuchungen von Wieland und Berg (Angew. Chem. **64**, 418 [1952]) zeigen jedoch, daß bei oxydativ nachbehandelten Papieren („Karboxyl-Papieren“) der Ionenaustausch bestimmend werden kann.“

Es mag hier darauf hingewiesen werden, daß bei der Methylierung mit Diazomethan natürlich nicht die mit Kationen bereits besetzten Karboxylgruppen des Papiers erfaßt wurden, die beim Austausch auf dem Papier während des papierchromatographischen Vorganges wesentlich beteiligt sein können. Die Ergebnisse von Horner, Enrich und Kirschner brauchen daher nicht gegen die Möglichkeit des Austauschvorganges in *Schutes* Sinne während der Elution zu sprechen.



Als Ergebnis seiner Versuche hinsichtlich der Entstehung anormaler Chromatogramme macht *Schute* [69] mehrere Feststellungen. Es kann zunächst der Schluß gezogen werden, daß in der Papierchromatographie Adsorption polarer Art eintreten kann. Die Neigung hierzu nimmt mit steigendem polaren Charakter des gelösten Stoffes zu, wird aber aus wäßrigen Lösungen nicht erfolgen, da dieses den polaren Stoff aus einer Adsorptionsverbindung verdrängen würde. Enthält ein Elutionsmittel nur wenig Wasser, so wird die Möglichkeit zur Adsorption gegeben sein, wodurch sich der in der Praxis oft zu findende Zusatz von etwa 20% Wasser zum Elutionsmittel zur Erlangung einwandfreier Verteilung gut erklären läßt.

Bei nicht zu geringem Wassergehalt wird die Entstehung eines anormalen Chromatogramms auf den Einfluß der Dissoziation und nicht auf Adsorption zurückzuführen sein. Bei der Dissoziation der organischen Säuren können die Wasserstoffionen durch Ionenaustausch festgehalten werden, während die Anionen normal wandern, weshalb man in solchen Fällen immer die Anionen nachweisen muß, was bei organischen Säuren allerdings erhebliche Schwierigkeiten macht. Nach *Schute* sind bei Glutamin- und Asparaginsäure mit einem neutralen Elutionsmittel dann normale Flecke zu erhalten, wenn mit Ninhydrinlösung der Nachweis erfolgt, also des Anions und nicht des Kations, wie es bei Verwendung von Indikatorlösungen der Fall ist.

Zur Verhinderung der Adsorption und Erlangung einwandfreier Chromatogramme wird man im allgemeinen mit dem Zusatz einer polaren Verbindung zum Elutionsmittel, besonders von Wasser, auskommen, wenn nicht Einschuß in die amorphen Zellulosegebiete oder schlechte Löslichkeit im Elutionsmittel vorliegt.

Dem Ionenaustausch wird man dadurch begegnen können, daß die Dissoziation des gelösten Stoffes zurückgedrängt wird, bei Säuren z. B. durch Zusatz einer stärkeren Säure, die außerdem den Ionenaustausch schon vor der Untersuchungssäure vollzieht, oder indem man schon vorher mit Säure eluiertes Papier verwendet.

Bei Alkaloiden kann Ionenaustausch ebenfalls durch Zurückdrängen der Dissoziation, z. B. durch Zusatz von Ammoniak oder Mineralsäure, jedoch auch durch einen Überschuß eines Elektrolyten in der stationären Phase verhindert werden. *Schute* berichtet von eigenen geglückten Versuchen, normale Chromato-

gramme von Alkaloiden durch Elution mit  $\frac{n}{10}$  Kaliumchloridlösung zu erhalten

(Wasser brachte anormale Chromatogramme) und verweist auf die Versuche von *Munier*, *Macheboeuf* und *Cherrier* [61], die das Papier mit Kaliumchloridlösung verschiedener Stärke imprägnierten und dann viel weniger Säure zum Elutionsmittel zusetzen brauchten, um normale Chromatogramme zu erhalten, als dieses bei unbehandeltem Papier der Fall war. Auf die von *Hagdahl* und *Tiselius* [31] durchgeführten guten Trennungen von Aminosäuren mit starken Salzlösungen als Elutionsmittel sei hier nur hingewiesen. Interessanterweise ist in gewissem Umfang die Reihenfolge der *R* -Werte dabei umgekehrt im Vergleich zu den

jenigen, die in den Versuchen mit wassergesättigtem Butanol erhalten wurden. Eine im Sinne *Schutes* erfolgende Deutung läßt jedoch nicht, wie die Verfasser es tun, an Adsorption denken, da ja infolge der Elution mit der wäßrigen Lösung eine die Adsorption verhindernde, wäßrige stationäre Phase vorhanden ist, sondern wird für diese Trennung ebenfalls Ionentausch und Verteilung verantwortlich machen.

\*

Das letzte Kapitel dieser Ausführungen sei der theoretischen Grundlage der Verteilung vom Standpunkt der chemischen Konstitution der gelösten Substanz sowie des Lösungs- bzw. Elutionsmittels aus und den bisher aufgefundenen Beziehungen zwischen chemischer Konstitution einerseits und  $R_f$ -Wert der gelösten Substanz andererseits gewidmet. Zu dem erstgenannten Problem hat *Martin* [51] sehr interessante Ausführungen gemacht, die im folgenden teilweise wiedergegeben seien. *Martin* geht zunächst in dem Bestreben, den Mechanismus der Verteilung einer Substanz zwischen zwei Flüssigkeiten quantitativ aufzuklären und damit den Anfang zu einer Vorausberechnung der Verteilung dieser Substanz zu legen, von dem Gedanken aus, daß jede spezifische Gruppe einer Molekel auch ein spezifisches chemisches Potential besitze. Daher besitze z. B. eine Aminosäure, die 3 solche spezifische Gruppen hat, nämlich die  $\text{NH}_3^+$ -, die  $\text{COO}^-$ - und die  $(\text{CH}_2)$ -Gruppe, als chemisches Potential die Summe der 3 den einzelnen Gruppen zukommenden Einzelpotentiale, was *Martin* auch mathematisch formuliert. Dabei fand er, daß der Verteilungskoeffizient dieser Verbindung nur von der Natur dieser Gruppen und dem verwendeten Lösungsmittelpaar, nicht aber von dem Rest der Molekel abhängig ist. Daraus folgt z. B., daß isomere Verbindungen meist einen sehr ähnlichen Verteilungskoeffizienten für ein gegebenes Lösungsmittelpaar haben werden (Abweichungen etwa nur 30%, während die sonstigen Verbindungen einen Faktor von 1000 und mehr haben können), ihre Trennung daher sehr schwer sein wird. Andererseits besitzen Glieder einer homologen Reihe ein verschiedenes Potential (nach Auffassung von *Martin*) und werden sich bei Wahl eines richtigen Lösungsmittelpaares auch trennen lassen. Die Richtigkeit dieser Ansicht hat die chromatographische Trennung der Aminosäuren eindrucksvoll bewiesen.

*Martins* Ausführungen hatten also die Feststellung und Errechnung der freien Energie zum Ziele, die für ideale Lösungen zum Transport von z. B. 1 Mol einer gelösten Substanz von einem Lösungsmittel zu einem anderen notwendig ist. Dieses verfolgte *Pardee* [63] an Hand eines großen papierchromatographischen Analysenmaterials von *Knight* [40] weiter und konnte graphisch einen linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Peptidbindungen und einem von ihm errechneten mathematischen Ausdruck

$$\left( RT \ln \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right) - \sum RT \ln \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right)_{AA} \right)$$

zeigen, in dem die  $R_f$ -Werte der Peptidverbindungen eine Rolle spielten (ausgedrückt in Kalorien je Peptidbindung). Aus seinen Befunden war es umgekehrt

auch möglich,  $R_f$ -Werte von Peptiden (auf energetischer Grundlage) zu berechnen, deren Werte nur selten von den experimentell gefundenen stärker abweichen. Auf diese Weise ist es nach Ansicht des Verfassers auch möglich, das Molekulargewicht von Peptiden, die aus bekannten Aminosäuren zusammengesetzt sind, aus den beobachteten  $R_f$ -Werten unter gewissen Voraussetzungen zu berechnen.

Auch *Bremner* und *Kenten* [11] prüften die Gültigkeit der Ableitungen von *Martin* [51] an homologen Reihen von n-Alkyl-monoaminen und Polymethylen-diaminen. Die Verfasser trugen die Werte für  $\log \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right)$  gegen die Anzahl der Methylengruppen, die sich ja als einzige in dieser homologen Reihe ändert, ihrer untersuchten homologen Verbindungen auf und erhielten in verschiedenen Elutionsmitteln eine Reihe von annähernd parallelen Linien.

Mit den bisher angeführten Betrachtungen war *Martin* [51] der quantitativen Seite der Bindung und Verteilung einer gelösten Substanz nähergetreten. Er versuchte aber auch ein Bild von der Natur der Kräfte zu entwerfen, die bei der Festlegung der Verteilungskoeffizienten von Wichtigkeit sind und wählte dabei das Beispiel der Verteilung einer Verbindung mit einer  $\text{CH}_2$ -Gruppe zwischen Zylohexan und Wasser als Lösungsmittel. Die van der Waalsschen Kräfte der  $\text{CH}_2$ -Gruppe einerseits zu Wasser, andererseits zu Zylohexan werden wahrscheinlich nicht sehr groß sein, weshalb eine Annäherung an beide Lösungsmittel stattfinden wird. Dieses ist bei Zylohexan sehr einfach, da diese Flüssigkeit ihrerseits nur durch van der Waalsschen Kräfte zusammengehalten wird im Gegensatz zum Wasser, in dem gegenseitige starke Wasserstoffbrückenbindungen vorhanden sind. Daher wird die Verteilung der  $\text{CH}_2$ -Gruppe sehr stark zugunsten des Zylohexans ausfallen. Übrigens können die van der Waalsschen Kräfte auch ziemlich spezifisch wirken, weshalb Benzol mehr aromatische und Zylohexan besser aliphatische Substanzen lösen wird, was *Martin* mit dem räumlichen Bau begründet. Darauf sei auch die hohe Affinität von aktiver Kohle für aromatische Ringe zurückzuführen; in dieser sei der C—C Abstand graphitähnlich und daher dem Bau aromatischer Substanzen verwandt. Andererseits werden sterische Gründe manchmal dafür verantwortlich zu machen sein, wenn sich Substanzen trotz theoretischer Unwahrscheinlichkeit (auf Grund der Summe der chemischen Potentiale der einzelnen Gruppen) doch chromatographisch trennen lassen, wie es von einzelnen Peptiden und Zuckern bekannt ist (s. auch spätere Ausführungen). Sterische Faktoren werden nach *Martins* Ansicht bei der Adsorption eine besonders wichtige Rolle spielen, da nur eine Seite der Molekel im allgemeinen mit dem Adsorbens in Kontakt treten wird, weshalb bei der Trennung von Isomeren meist die Adsorptionschromatographie wirksamer als die Verteilungschromatographie sein wird.

Schließlich widmet *Martin* noch einige Ausführungen den Wasserstoffbrückenbindungen, von denen bisher öfter die Rede war und die für die Festlegung des Verteilungskoeffizienten von großer Bedeutung sind, zumal sie stärker als die van der Waalsschen Kräfte sind. Phenol als Protonendonator, Kollidin (allgemein Amine) als Protonenakzeptor seien gute Beispiele hierfür, während Wasser sowohl



Akzeptor wie Donator ist, ebenso wie die Karboxylgruppe, deren Hydroxylcharakter (Donator) allerdings vorherrscht. Als Beispiel aus der Praxis führt *Martin* die Chromatographie von Prolin bzw. Valin mit Butanol bzw. Phenol an. Bei Phenol als Elutionsmittel läuft Prolin schneller als Valin, bei Butanol ist es umgekehrt. Die Iminogruppe des Prolins ist ein stärkerer Protonenakzeptor als die Aminogruppe des Valins, andererseits ist Phenol ein stärkerer Protonendonator als Butanol, woraus sich das geschilderte Verhalten dieser Substanzen bei der Chromatographie einfach erklären läßt. Bei der schnelleren Wanderung des Valins bei Butanol als Elutionsmittel wird man auch noch an die größere Verwandtschaft der beiden Substanzen auf Grund des gemeinsamen aliphatischen Charakters denken.

Als weitere Bindungsart kommt nach *Martin* [51] die Ionenbindung in Frage, die noch stärker als die Wasserstoffbrückenbindung ist und bei Verteilungsvorgängen auch in Frage kommen kann, besonders bei schwachen Säuren und Basen, wobei die Verwendung von polaren Phasen eine besondere Rolle spielen oder ein Variieren des  $p_H$ -Wertes sehr wichtig für die Größe des Verteilungskoeffizienten sein wird. Eine Anwendung dieses Prinzips stellt die Verwendung von gepuffertem Papier dar.

\*

Schließlich sei noch auf einige Folgerungen eingegangen, die aus dem Auftreten von Wasserstoffbrückenbindungen bei papierchromatographischen Arbeiten sich ergeben haben und mit der Frage der Beziehung zwischen chemischer Konstitution und  $R_f$ -Wert zusammenhängen. So folgerten *Jermyn* und *Isherwood* [37, 36] bei der Untersuchung der Beziehung der chemischen Struktur und besonders der Konfiguration der Hydroxylgruppen von Zuckern (Mono-, Di- und Trisaccharide sowie Glykoside) zu deren relativen Wanderungsstrecken ( $R_f$ -Wert) aus der Tatsache der Auftrennungsmöglichkeit ganzer Gruppen von Zuckern mit gleicher Hydroxylgruppenanzahl und wahrscheinlich auch gleicher Ringstruktur den bedeutenden Einfluß der räumlichen Anordnung der Hydroxylgruppen als Wechselwirkung zu den Bestandteilen beider Phasen während der Chromatographie. Glieder von Reihen solcher Zucker, die bei gleicher Ringstruktur und Konfiguration der Hydroxylgruppen sich nur an einem einzigen C-Atom im Substituenten unterscheiden, zeigten große Ähnlichkeit auf dem Papierchromatogramm. Die Verfasser konnten sogar gewisse Beziehungen zwischen Schmelzpunkt und  $R_f$ -Wert eines Zuckers finden — bei Aldopentosen und -hexosen ist der Schmelzpunkt etwa umgekehrt proportional dem  $R_f$ -Wert —, was verständlich wird, wenn man bedenkt, daß die Stärke der inneren Bindung in einer Zuckermolekel in bedeutendem Maße von der Assoziation der Hydroxylgruppen abhängt, die andererseits auf die Größe des  $R_f$ -Wertes einen bedeutenden Einfluß haben dürften, da eine stärkere Bindung an die Wassermolekeln des Zellulose-Wasser-Komplexes — die Verfasser schließen sich stark den bereits geschilderten Vorstellungen von *Hanes* und *Isherwood* [64] an — ein Sinken des  $R_f$ -Wertes zur Folge haben muß.

Die Verfasser stellten außerdem eine gleichsinnige Veränderung der  $R_f$ -Werte von Zuckern mit steigendem Wassergehalt in Elutionsmittel fest, die sie linear

fanden, wenn die verwendeten mathematischen Ausdrücke logarithmiert wurden. Als Grundlage dieser gefundenen Beziehungen zwischen  $R_f$ -Werten der Zucker und dem Wassergehalt des Elutionsmittels sehen sie die Tatsache an, daß die Zuckermolekeln in Lösung auf Grund ihrer vielen Hydroxylgruppen eine starke Affinität zu Wassermolekeln haben, wobei Wasserstoffbrückenbindungen eintreten — es findet also eine starke Hydratisierung der Zucker statt. Andererseits ist die Affinität der Zucker zu neutralen organischen Elutionsmittelmolekeln wegen des Fehlens von Hydroxylgruppen klein, wenn diese nicht ebenfalls z. B. Wasser enthalten. Die Verteilung eines Zuckers zwischen einem wasserhaltigen Elutionsmittel und dem Zellulose-Wasser-Komplex wird also stark von dem leicht erreichbaren Wasser in den zwei Phasen abhängen, und da die Zusammensetzung des Zellulose-Wasser-Komplexes nur wenig durch den eventuell variierenden Wassergehalt des organischen Elutionsmittels beeinflusst wird, wird die Verteilung eines Zuckers stark von dem Wassergehalt des organischen Elutionsmittels kontrolliert.

Zu prinzipiell gleichen Ergebnissen kamen *Bate-Smith* und *Westall* [3] bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen chromatographischem Verhalten und chemischer Struktur, wobei sie für ihre Versuche natürlich vorkommende Anthozyane, Flavone usw. ( $C_{15}$ -Verbindungen) sowie Phenolabkömmlinge, die sich bei deren Abbau bildeten, verwendeten. Als sehr geeignetes Hilfsmittel erwies sich dabei die von *Martin* [51] gegebene Formulierung seiner theoretischen Ableitungen, die bereits erwähnt wurde. Sie stellten fest, daß bei Substanzen mit variierender Anzahl von Hydroxylgruppen in erster Linie die Anzahl, dann erst in geringerem Maße die Stellung solcher Gruppen auf den  $R_f$ -Wert von Einfluß ist, wobei ein Steigen der Hydroxylgruppenanzahl ein Fallen der  $R_f$ -Werte zur Folge hat. Verständlicherweise setzt eine Methylierung von Hydroxylgruppen die Neigung zur Wasserstoffbrückenbildung mit Wassermolekeln auch des Zellulose-Wasser-Komplexes stark herab, weshalb die  $R_f$ -Werte derartiger Substanzen höherliegen als diejenigen nichtmethylierter Verbindungen. Glykosidbildung verursacht im allgemeinen ein starkes Absinken der  $R_f$ -Werte im Vergleich zu denjenigen der zugehörigen Aglykone (s. dazu Abbildung im Original). Unregelmäßiges abweichendes Verhalten hiervon wurde bei der Glykosidbildung mit Rhamnose beobachtet.

Interessante Folgerungen ziehen die Verfasser aus dem chromatographischen Verhalten einiger Verbindungen, deren formelmäßige Anzahl von Hydroxylgruppen bekannt ist, deren chromatographisches Verhalten aber auf eine andere Anzahl von Hydroxylgruppen deutet (z. B. bei Morin, Fisetin und Quercetin). Hier konnte die Papierchromatographie zur Klärung der Frage beitragen, in welcher Form die Verbindungen — mindestens in gelöster Form — vorliegen. Auch die Chelatbildung bei benachbarten Hydroxylgruppen in Phenolen und deren Derivaten zeigt sich deutlich in der Erhöhung der  $R_f$ -Werte (also Erniedrigung der Affinität zum Zellulose-Wasser-Komplex der stationären Phase) gegenüber solchen Verbindungen, die zu solchen Chelatbindungen nicht fähig sind (Beispiel Salizylsäure gegenüber m- bzw. p-Oxybenzoesäure). Bei der papierchromatographischen Untersuchung von Salizylsäurederivaten [81] sowie von Di- und

Trioxymethylen [82] hat *Wagner* analoge Ergebnisse erhalten. Bei der Untersuchung von Teekatechinen wurden ähnliche Fragen von *Bradfield* und *Bate-Smith* [8] behandelt, wobei u. a. das Verhalten diastereoisomerer Verbindungen hinsichtlich der  $R_f$ -Wertänderungen untersucht wurde.

Weitere Arbeiten mit ähnlichen Befunden wurden von *Foster* und *Karrer* [27], die das Verhalten einiger Flavine in Papierchromatogrammen hinsichtlich Hydroxylgruppenanzahl und Höhe des  $R_f$ -Wertes prüften, von *Paris* [64] bei der Untersuchung von Flavonen, Flavonolen, Isoflavonen und deren Glykosiden sowie von Chalkonen, ferner von *Lugg* und *Overell* [48] bei der Untersuchung der Papierchromatographie organischer Säuren durchgeführt. Die Feststellung der letztgenannten Autoren, daß die  $R_f$ -Werte von organischen Säuren bei steigender Anzahl der Karboxylgruppen oder der nichtkarboxylhaltigen Hydroxylgruppen, bei Gegenwart von nichtkarboxylhaltigen Carbonylgruppen sowie bei Verringerung des Kohlenwasserstoffcharakters (d. h. in der Anzahl der  $\text{CH}$ -,  $\text{CH}_2$ - und  $\text{CH}_3$ -Gruppen) niedriger werden, läßt sich ebenfalls einfach durch Steigerung der Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbildung zum Zellulose-Wasser-Komplex der stationären Phase deuten. *Benson* und Mitarbeiter [4] untersuchten besonders die Beziehungen der  $R_f$ -Werte von Karbonsäuren zum Verteilungskoeffizienten in angesäuertem Medium, wobei sie  $R_f$ -Wert und Verteilungskoeffizient von Alanin als Standard experimentell prüften, mit deren Hilfe den Wert für  $\frac{A_s}{A_L}$  in der Formel von *Gordon*, *Martin* und *Synge* [18] errechneten (in ihren Versuchen war  $\frac{A_s}{A_L} = 0,55$ ) und dann die für die anderen Karbonsäuren mit Hilfe der dadurch erhaltenen Formel

$$R_f = \frac{1}{(1 + 0,55 \cdot \alpha)}$$

berechneten  $R_f$ -Werte mit den experimentell gefundenen verglichen und in guter Übereinstimmung fanden. Außerdem brachte diese Tatsache auch wieder zusätzlich den Beweis, daß dabei Verteilungschromatographie vorlag.

\*

Abschließend kann festgestellt werden, daß sich aus der Betrachtung der angeführten Arbeiten ein recht deutliches Bild von den Vorgängen während der Papierchromatographie entwickelt hat, wozu besonders die theoretischen und experimentellen Arbeiten von *Martin* sowie von *Schute* beigetragen haben. Selbstverständlich sind noch eine ganze Reihe von Fragen im Zusammenhang mit dem Mechanismus während des papierchromatographischen Prozesses offengeblieben, die ihrer Bearbeitung und Lösung harren.



## SCHRIFTTUM

1. *Algar, Giertz und Gustafsson*, Svensk Papperstidn. **54**, 335 (1951), (zitiert nach 69.).
2. *Aronoff*, Science **110**, 590/91 (1949).
3. *Bate-Smith und Westall*, Biochim. biophysica Acta **4**, 427/40 (1950).
4. *Benson, Bassham, Calvin, Goodale, Haas und Stepken*, J. Amer. chem. Soc. **72**, 1710/18 (1953).
5. *Bentley und Whitehead*, Biochem. J. **46**, 341/45 (1950).
6. *Berl*, Physical Methods in chemical Analysis Vol. II, 591—617 (1951).
7. *Block, Le Strange, Zweig*, Paperchromatography, Seite 4—14 (1950).
8. *Bradfield und Bate-Smith*, Biochim. biophysica Acta **4**, 441/44 (1950).
9. *Bräuniger*, Papierchromatographie der Alkaloide, Pharmazie **9**, (1954), 643—654, 719—734 und 834—843.
10. *Bräuniger und Borgwardt*, Pharmazie **8**, 909—913 (1953).
11. *Bremner und Kenten*, Biochem. J. **48**, 651—655 (1951).
12. *Broda und Schönfeld*, Mh. Chem. **81**, 459—461 (1950).
13. *Burma*, Analyt. Chem. **25**, 549—553 (1953).
14. *Derselbe*, Analyst **77**, 382 (1952).
15. *Burma und Banerje*, Sci. and Cult. (India) **15**, 363 (1950), (zitiert nach 13.).
16. *Cassidy*, Analyt. Chem. **24**, 1415—1421 (1952).
17. *Champetier*, C. R. Acad. Sci. **195**, 280/82 (1932).
18. *Conden, Gordon und Martin*, Biochem. J. **38**, 224 (1944).
19. *Cramer*, Papierchromatographie (2. Aufl. 1952).
20. *Craig*, Analyt. Chem. **22**, 1346 (1950).
21. *Decker*, Die Pharmazie **8**, 371—386 u. 477—484 (1953).
22. *Decker und Riffart*, Chemikerztg. **74**, 273 (1950).
23. *Dohle*, Chemikerztg. **77**, 405 (1953).
24. *England und Cohn*, J. Amer. chem. Soc. **57**, 634 (1935).
25. *Erbring*, Kolloid-Z. **125**, 99 (1952).
26. *Farrar, Neale und Williamson*, Nature **167**, 524 (1951).
27. *Foster und Karrer*, Helv. chim. Acta **36**, 1530—1531 (1953).
- 27a. *Frey-Wyssling und Mühlethaler*, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe **1951**, 1—27 (Springer-Verlag, Wien).
28. *Glueckauf*, Discussion Faraday Soc. **7**, 12—25 u. 199—213 (1949).
29. *Gordon, Martin und Synge*, Biochem. J. **37**, Proced. XIII (1943).
30. *Grüne, A.*, Arzneimittelforschung **4**, 347—354 (1954).
31. *Hagdahl und Tiselius*, Nature **170**, 799—800 (1952).
32. *Hanes und Isherwood*, Nature **164**, 1107—1111 (1949).
33. *Hermans*, Physics and Chemistry of Cellulose Fibres, Amsterdam 1949.
34. *Hoyer*, Chem. Ber. **86**, 1016—1027; dort weitere Literaturangaben.
35. *Husemann und Weber*, J. prakt. Chem. **159**, 335 (1941).
36. *Isherwood und Jermyn*, Biochem. J. **48**, 515—524 (1951).

37. *Jermyn und Isherwood*, Biochem. J. **44**, 402—407 (1949).
38. *Jernstad und Jensen*, Pharmac. Acta Helvetiae **25**, 209—229 (1950).
39. *Kanamaru und Chao*, Kolloid-Z. **84**, 85 (1938), (zitiert nach 69.).
40. *Knight*, J. biol. Chemistry **190**, 753—756 (1951).
41. *Kowkabany und Cassidy*, Analyt. Chem. **22**, 817/19 (1950).
42. Dieselben, Analyt. Chem. **24**, 643/653 (1953).
43. *Lang*, Dtsch. Apoth. Ztg. **91**, 125 (1951).
44. *Lederer*, Bull. Soc. chim. **19**, 815—821 (1952).
45. Derselbe, Nature **162**, 776/77 (1948).
46. *Lederer und Lederer*, Chromatography
47. *Lugg und Overell*, Nature **160**, 87 (1947).
48. Derselbe, Austral. J. sci. Res., Ser. A **1**, 98—111 (1948).
49. *Martin*, Endeavour, Bd. VI 21—28. (1947).
50. Derselbe, Annual Review Biochem. **19**, 517—542 (1950).
51. Derselbe, Biochem. Soc. Symposia **3**, 4 (1949).
52. *Martin und Synge*, Biochem. J. **35**, 91 (1941).
53. Dieselben, Biochem. J. **35**, 1358 (1941).
54. *Meinhard*, Science **110**, 387 (1949).
55. *de Moerloose*, Pharmac. Tijdschr. voor Belgie **29**, 117—121 (1952).
56. *Moore und Stein*, Annual Review of Biochemistry **21**, 521—546 (1952).
57. Dieselben, Ann. N. Y. Acad. Sci. **49**, 265 (1948); J. biol. Chem. **178**, 53 (1949).
58. *Munier und Macheboeuf*, Bull. Soc. Chim. biol. **31**, 1144 (1949).
59. Dieselben, ebenda **32**, 192—212 (1950).
60. Dieselben, ebenda **32**, 904—907 (1950).
61. *Munier, Macheboeuf und Cherrier*, ebenda **34**, 204 (1952).
62. *Neale und Williamson*, Nature **171**, 842 (1953).
63. *Pardee*, J. biol. Chemistry **190**, 757—762 (1951).
64. *Paris, R.*, Bull. Soc. Chim. biol. **34**, 767—772 (1952).
65. *Rauen*, Handbuch der Physiol.- und Pathol.- chemischen Analyse, 10. Aufl., 1. Bd., Seite 200—204. (1953).
66. *Romano, C.*, Minerva Medicolegale **70**, 172—174 (1950).
67. *Schönfeld und Reinharz*, Mh. Chem. **83**, 753—757 (1952).
68. *Schönfeld und Broda*, Mikrochem. **36/37**, 537 (1951).
69. *Schute*, Dissert. Arbeit Leiden 1953.
70. Derselbe, Meded. vlaamse Chem. Veren. **15**, 1—12 (1953).
71. Derselbe, Pharmac. Weekbl. **86**, 33—64 (1951).
72. Derselbe, ebenda **86**, 201—211 (1951).
73. Derselbe, ebenda **86**, 33—64 (1951).
74. Derselbe, Nature **171**, 839 (1953).
75. Derselbe, Chem. Weekbl. **49**, 301—305 (1953).
76. *Signer und Travel*, Chimia **5**, 245—249 u. 256—260 (1951).
77. *Staudinger und Dohle*, J. prakt. Chem. **161**, 219 (1943).
78. *Synge*, Symposia Biochem. Soc. **3**, 90—96 (1949/51).
79. *Tappi*, Testing Methods, Recommended Practices Specifications, of the Technical Associations of the Pulp and Paper Ind. T 430 m-47 (1947). (Zitiert nach 16.).
80. Derselbe, ebenda T 471, sm 46.
81. *Wagner, G.*, Pharmazie **8**, 1021—1028 (1953).
82. Derselbe, Arch. d. Pharm. Ber. dtsch. Pharm. Ges. **286**, 269 (1953).
83. *Williams*, An Introduction to Chromatography. (London 1948).
84. *Zimmermann*, Z. anal. Chem. **138**, 321—332 (1953).

